

Salmonelleninfektionen in der Maus als Modelle für Wirt-Pathogen-Interaktion

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

vorgelegt von Mandy Reichenbach
aus Mühlhausen/ Thüringen

1. Referent: Professor Dr. Jürgen Wehland
2. Referent: Professor Dr. Martin Korte
eingereicht am: 05.05.2008
mündliche Prüfung (Disputation) am: 17.09.2008

Druckjahr 2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeitrag

M. Reichenbach, W. Müller, D. Bumann: **Role of IL-10 in innate immunity to gut microbes** - Infection System for innate immunity. (Poster) 37. ECI 2006 (16. Europäischer Kongress für Immunologie), Paris, Frankreich (2006)

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Zusammenfassung | 1 |
| 2 | Vorwort | 3 |
| 3 | Einleitung | 5 |
| 3.1 | Das intestinale Immunsystem | 6 |
| 3.1.1 | Aufbau des GALT | 6 |
| 3.1.2 | Unterscheidung zwischen Kommensalen und Pathogenen | 6 |
| 3.1.3 | Immunreaktion gegenüber Kommensalen Bakterien | 8 |
| 3.1.4 | Immunreaktion gegenüber Pathogenen | 9 |
| 3.2 | Virulenzfaktoren der Pathogene | 10 |
| 3.3 | IL-10 und seine Rolle bei der Immunantwort | 12 |
| 3.3.1 | Das Zytokin IL-10 | 12 |
| 3.3.2 | Der IL-10 Rezeptor | 12 |
| 3.3.3 | Bedeutung von IL-10 bei Infektionen und IBD | 13 |
| 3.4 | Zielsetzung der Arbeit | 14 |
| 4 | Ergebnisse | 15 |
| 4.1 | Etablierung eines <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium Infektionsmodells | 15 |
| 4.1.1 | Infektionen mit <i>Salmonella</i> Typhimurium | 16 |
| 4.1.2 | Entzündungsmarker und Versuchsaufbau | 17 |
| 4.1.3 | Validierung des Infektionsmodells | 18 |
| 4.2 | Kinetik einer <i>S. Typhimurium</i> $\Delta aroA \Delta asd$ Infektion in IL10 ^{-/-} Mäusen | 19 |
| 4.3 | Bakterielle Faktoren, die eine starke durch IL-10 regulierte angeborene Immunantwort auslösen | 22 |
| 4.3.1 | Infektion von IL10 ^{-/-} mit dem Probiotikum <i>E. coli</i> Nissle 1917 (EcN) . | 22 |
| 4.3.2 | Infektion von IL10 ^{-/-} mit SL1344 $\Delta aroA \Delta asd$, die zuvor mit Formaldehyd bzw. Gentamycin behandelt wurden. | 23 |
| 4.3.3 | Infektion von IL10 ^{-/-} mit SL1344 $\Delta aroA \Delta asd \Delta flhD$ (Flagellenmutante) | 25 |
| 4.3.4 | Infektion von IL10 ^{-/-} mit SL1344 $\Delta phoP \Delta invG \Delta ssrB$ | 26 |
| 4.3.5 | Infektion von IL10 ^{-/-} mit SL1344 $\Delta aroA \Delta asd \Delta phoP$, SL1344 $\Delta aroA \Delta asd \Delta invG$, SL1344 $\Delta aroA \Delta asd \Delta ssrB$ | 27 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.3.6 | Infektion von IL10 ^{-/-} mit SL1344 $\Delta aroA \Delta asd \Delta sipB$ | 28 |
| 4.4 | IL-10 im C3H/HeJ genetischen Hintergrund | 29 |
| 4.5 | Das IL-10 Netzwerk | 31 |
| 4.5.1 | Zelltypspezifische IL10 ^{-/-} : Wer ist der wichtigste IL-10 Produzent während der frühen Immunantwort? | 31 |
| 4.5.2 | Zelltypspezifische IL10R ^{-/-} : Wer ist der wichtigste Rezipient des IL-10 Signals während der frühen Immunantwort? | 32 |
| 4.5.3 | Analyse von IL4 ^{-/-} IL10 ^{<i>fl/fl</i>} CD4- <i>Cre</i> und IL12 ^{-/-} IL10 ^{<i>fl/fl</i>} CD4- <i>Cre</i> : Rolle von T-Zell-produziertem IL-10 bei einer Th1 oder Th2 dominierten Immunantwort. | 35 |
| 4.6 | Rolle von IL-10 bei einer wiederholten Infektion mit SL1344 $\Delta aroA \Delta asd$. . | 36 |
| 5 | Diskussion | 38 |
| 5.1 | Entwicklung eines Infektionsmodells | 38 |
| 5.2 | EcN induziert in IL10 ^{-/-} eine weniger starke Immunantwort als <i>Salmonella</i> . | 40 |
| 5.3 | Lebensfähige Salmonellen sind notwendig, um eine verstärkte Entzündungsreaktion in IL10 ^{-/-} auszulösen | 41 |
| 5.4 | Eingrenzung der entzündungsauslösenden Faktoren auf SPI-1 Effektoren . | 42 |
| 5.5 | Essentielle Rolle des Toll-like Rezeptors 4? | 44 |
| 5.6 | Das IL-10 Netzwerk: Entscheidende Rolle von T-Zellen bei einer Th1-dominierten Immunantwort | 45 |
| 5.7 | IL-10 notwendig für die Ausbildung einer Toleranz | 48 |
| 5.8 | Abschließende Bemerkung | 48 |
| 6 | Einleitung | 51 |
| 6.1 | <i>Salmonella</i> -Infektionen | 51 |
| 6.2 | Chronische Infektionen - Persister | 53 |
| 6.2.1 | Systemische Ausbreitung von <i>Salmonella</i> Typhimurium in der Maus . | 54 |
| 6.2.2 | Überleben von <i>Salmonella</i> Typhimurium in Makrophagen | 55 |
| 6.2.3 | Wirtsfaktoren zur Kontrolle der intrazellulären bakteriellen Replikation | 55 |
| 6.3 | Zielsetzung der Arbeit | 56 |
| 7 | Ergebnisse | 57 |
| 7.1 | Toxin/ Antitoxin-Module | 58 |
| 7.1.1 | Test eines arabinoseinduzierbaren Plasmids | 58 |
| 7.1.2 | Das Toxin HipA | 59 |
| 7.1.3 | Das Toxin RelE | 62 |
| 7.2 | Überexpression eines Gyrase Inhibitors: SbmC | 63 |
| 7.3 | Persistenzzustand durch Behandlung mit Gentamycin | 64 |
| 7.4 | Persistenzmodell mit spezifischen Mutanten von <i>Salmonella</i> Typhimurium . | 68 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|------------|
| 8 Diskussion | 76 |
| 9 Material | 80 |
| 9.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme | 80 |
| 9.2 Nährmedien, Medienzusätzen und Antibiotika | 80 |
| 9.3 Puffer | 82 |
| 9.4 Kits | 82 |
| 9.5 Laborausstattung | 83 |
| 9.6 Oligos | 83 |
| 9.7 Bakterienstämme | 84 |
| 9.8 Plasmide | 86 |
| 9.9 Versuchstiere | 87 |
| 10 Methoden | 89 |
| 10.1 Methoden zu Teil 1 | 89 |
| 10.1.1 Wachstumsbedingungen der Bakterienstämme | 89 |
| 10.1.2 Infektionsmodell | 89 |
| 10.1.3 Bestimmung der KBE | 90 |
| 10.1.4 Bestimmung der Zellzahl | 90 |
| 10.1.5 Durchflusszytometrische Analyse der PMN-Infiltration in die PP . . . | 90 |
| 10.1.6 Immunhistochemie | 91 |
| 10.1.7 Statistische Auswertung | 92 |
| 10.2 Methoden zu Teil 2 | 92 |
| 10.2.1 Transformation via Elektroporation | 92 |
| 10.2.2 Bakterienmutantenerzeugung mittels PCR (Datsenko) | 93 |
| 10.2.3 Bakterienmutantenerzeugung mittels P22 Phagentransduktion | 95 |
| 10.2.4 Kolonie – PCR | 96 |
| 10.2.5 Wachstumsbedingungen der Bakterienstämme | 97 |
| 10.2.6 Infektionsmodell | 97 |
| 10.2.7 KBE-Bestimmung | 98 |
| 10.2.8 Arabinoseinduktion von Plasmiden | 98 |
| 10.2.9 SPI 1- Induktion mittels M9-Mangelmedium | 98 |
| 10.2.10 Generierung des arabinoseinduzierbaren pBAD18 GFP Plasmids . . | 99 |
| 10.2.11 Durchflusszytometrische Bestimmung der GFP – Fluoreszenz | 99 |
| Literaturverzeichnis | 101 |
| Abkürzungsverzeichnis | 118 |
| Danksagung | 121 |

1. Zusammenfassung

Das immunsuppressive Zytokin Interleukin-10 (IL-10) ist für die Entwicklung einer mukosalen Toleranz grundlegend und verhindert eine chronische Entzündung des Darms gegenüber der kommensalen Mikroflora. Die Rolle von IL-10 in der adaptiven Immunität wurde in dieser Hinsicht bereits intensiv untersucht. Seine Funktion bei der frühen angeborenen Immunantwort im Darm gegen pathogene Mikroorganismen war Gegenstand des ersten Teilprojekts in dieser Arbeit. Dafür wurden IL-10 defiziente Mäuse und kongene Wildtypmäuse mit dem typischen Nahrungsmittel-Pathogen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infiziert und die nachfolgende Entzündungsreaktion analysiert. Durch Vergleich verschiedener attenuierter Salmonellen-Mutanten sollten bakterielle Faktoren, die bei einer IL-10 regulierten angeborenen Immunantwort von Bedeutung sind, identifiziert werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass nach einer oralen Salmonellen-Infektion die Peyerschen Platten des Darms von IL-10 defizienten Tieren anfänglich ähnlich stark von Neutrophilen infiltriert wurden wie bei Wildtyp-Mäusen. Interessanterweise konnten zu einem späteren Zeitpunkt (20 h nach Infektion) aber deutlich mehr Neutrophile in den Peyerschen Platten von IL-10 defizienten Tieren nachgewiesen werden, als bei den Kontrolltieren. Offenbar war IL-10 wichtig für die Begrenzung einer Entzündungsreaktion im Darm. Dieser IL-10 Effekt könnte von Salmonellen-Virulenzfaktoren abhängen, da der Kommensale *E. coli* Nissle 1917 zwar auch eine Neutrophilen-Infiltration auslöste, diese aber von IL-10 unabhängig war. Ein Vergleich verschiedener Salmonellen-Mutanten zeigte, dass die IL-10 abhängige Entzündungsreaktion insbesondere durch Translokation von Effektorproteinen des Invasions-assoziierten *Salmonella* Typ-3-Sekretionssystem in Wirtszellen ausgelöst wurden.

Um die bei diesem Prozess beteiligten Wirts-Zelltypen zu identifizieren, wurden Mäuse mit zelltypspezifischem IL-10 und IL-10 Rezeptor *knock-out* infiziert. Die Ergebnisse legen nahe, dass weder Makrophagen und Neutrophile, noch B- oder T-Zellen alleinige Produzenten oder Rezipienten des modulierenden IL-10 Signals waren. Möglicherweise sind andere Zelltypen wie z.B. Dendritische Zellen oder mehrere teilweise redundante Zelltypen beteiligt. Auf diese zweite Möglichkeit deutet die nachweisbare Rolle von T-Zellen als IL-10 Produzenten zur Unterdrückung einer *Salmonella*-Entzündungsreaktion in Mäusen hin, die

ZUSAMMENFASSUNG

aufgrund einer zusätzlichen IL-4 Deletion verstärkt zu pro-inflammatorischen Reaktionen neigen. Des Weiteren konnte eine Rolle von IL-10 bei der Ausbildung einer Toleranz nach Mehrfachinfektionen mit *Salmonella* Typhimurium beobachtet werden.

Insgesamt erwies sich damit das hier entwickelte Infektionsmodell als geeignet, um sowohl bakterielle als auch Wirts-Faktoren zu identifizieren, die die angeborene mukosale Immunantwort beeinflussen.

Im zweiten Teilprojekt wurde ein Infektionsmodell entwickelt, um Interaktionen zwischen persistierenden Bakterien und dem Wirt zu untersuchen und neue Zielmoleküle für eine Antibiotika-Therapie gegen chronische Infektionen zu identifizieren. Da die meisten herkömmlichen Antibiotika aktive Prozesse der Zelle angreifen, sind sie gegen Bakterien, die sich während der Persistenz in einem dormanten Zustand befinden, unwirksam. Während rekombinante Salmonellen mit überexprimierten bakteriostatischen Proteinen aus Toxin-Antitoxin-Modulen keine überzeugenden Daten lieferten, konnten eingeschränkt brauchbare Persistenzmodelle mit Salmonellen-Mutanten im Purinstoffwechsel oder dem für intrazelluläres Wachstum wichtigen SPI-2 Typ-3-Sekretionssystem etabliert werden. Im Hintergrund dieser beiden Mutanten wurden verschiedene Stoffwechselwege und weitere für die Zelle zentral wichtigen Prozesse blockiert. Einzige Mutationen in Zellwandsynthese und Riboflavinstoffwechsel führten zu einer eingeschränkten Salmonellen-Persistenz in infizierten Mäusen, jedoch waren selbst diese Mutanten noch in der Lage, dauerhaft bei erniedrigter Bakterienlast zu persistieren. Keine der getesteten Salmonellen-Aktivitäten waren demnach geeignete Zielmoleküle für eine wirksame antimikrobielle Therapie gegen chronische Infektionen. Diese Ergebnisse stehen mit den Schwierigkeiten, solche Therapien zu entwickeln, in Einklang.

2. Vorwort

Unter dem gemeinsamen Titel Salmonelleninfektionen in der Maus als Modelle für Wirt-Pathogen-Interaktion ist die vorliegende Arbeit in zwei Teile untergliedert. In Teil 1 wurde ein *Salmonella*-Infektionsmodell etabliert, um die frühe angeborene Immunantwort im Darm zu untersuchen und um die Rolle des Interleukins-10 (IL-10) darin zu bestimmen. Ziel von Teil 2 war es ein weiteres Modell zu entwickeln, mit dessen Hilfe der Vorgang der Etablierung eines Persistenzzustandes erforscht werden kann.

Teil 1 Um eine schädliche Überreaktion des Immunsystems gegenüber der residenten Mikroflora zu vermeiden, bildet der Wirt eine homöostatische Balance aus. Trotzdem ist er in der Lage bei Kontakt mit pathogenen Erregern mit einer entsprechenden Abwehrreaktion auf die Infektion zu reagieren. Welche Faktoren bei der frühen Unterscheidung zwischen „freundlich“ und „feindlich“ eine Rolle spielen ist aktuelles Thema der Forschung. Das Interleukin-10 spielt eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung einer spontanen chronischen Entzündung des Darms. Seine Rolle in der frühen angeborenen Immunantwort ist allerdings noch weitgehend unbekannt. Hier sollte mit Hilfe des Modellpathogens *Salmonella* Typhimurium zum Einen die Bedeutung von IL-10 kurz nach dem Eindringen eines Erregers untersucht werden, als auch weiterführend ein Infektionsmodell bestimmt werden, mit dessen Hilfe bakterielle Faktoren identifiziert werden können, welche eine Entzündungsreaktion einleiten. Die an dem Prozess beteiligten Wirts-Zelltypen sollten über IL-10 und IL-10-Rezeptor defiziente Tiere isoliert werden.

Teil 2 Ein anderes Salmonelleninfektionsmodell sollte dazu dienen wichtige Faktoren zu identifizieren, die es einem Bakterium ermöglichen in Wirtszellen zu persistieren. Nach einer akuten Infektion sind einige Pathogene dazu fähig in Wirtszellen zu überdauern und sind für ein erneutes Ausbrechen der Krankheit (Rückfall) verantwortlich. Diese Erreger sind aufgrund ihres physischen Zustands kaum zu behandeln. Dieses für die Medizin wichtige Gebiet ist leider nur unzureichend untersucht. Aus diesem Grund soll hier ein entsprechendes Modell entwickelt werden, um Faktoren die an der Interaktion zwischen dem Wirt und dem Pathogen in dieser Phase der Infektion verantwortlich sind, zu identifizieren um so neue Targets für Antibiotika darzulegen.

Teil 1

**Wirt-Pathogen-Interaktion der
frühen angeborenen IL-10 regulierten Immunantwort**

3. Einleitung

Die Zahl der im Darm residierenden Mikroorganismen ist um das zehnfache höher als die Anzahl eukaryotischer Zellen des menschlichen Körpers. Die Gruppe der Bakterien umfasst dabei zwischen 300 und 500 Spezies, welche für den Wirt auf verschiedenste Weise von Nutzen sind und folglich vom Immunsystem toleriert werden [64] [65]. Der Beitrag zur Nährstoffverwertung, die Entwicklung und Erhaltung des intestinalen Epithels, der Einfluss auf die Entwicklung und Funktion des mukosalen Immunsystems, sowie die Konkurrenz mit Pathogenen um Nährstoffe und Raum, sind nur einige Beispiele wie Kommensale für den Wirt von Nutzen sind [7] [179] [95] [157] [158]. Um eine homöostatische Balance zu erreichen, muss das intestinale Immunsystem zwischen schädlichen und nützlichen Bakterien unterscheiden können. Die Virulenzstrategien einiger enteropathogener Bakterien hingegen erlauben es ihnen, mit den endogenen Mikroorganismen zu konkurrieren, den Darm zu kolonisieren und eine Entzündungsreaktion auszulösen.

Über spezialisierte Epithelzellen (M-Zellen) innerhalb des Follikel-assoziierten Epithels - (FAE) im Darm werden kontinuierlich Mikroorganismen aus dem Lumen aufgenommen und dem intestinalen Immunsystem präsentiert. So wird eine adaptive Immunantwort gefördert und damit Schutz gegen Infektionen erreicht. Kommensale Mikroorganismen induzieren Toleranz durch kontinuierliche Aufnahme über M-Zellen und Dendritische Zellen (DCs) der Lamina Propria, die zu einer homöostatischen Balance führt. Dabei handelt es sich nicht um Toleranz im klassischen immunologischen Sinn, sondern eher um eine Art Mangel an Reaktion gegenüber diesen Bakterien (Anergie) [183] [55] [188] [81]. Dagegen stimulieren enteroinvasive Mikroorganismen, die in den Darm und die Peyerschen Platten (PP) gelangen, eine pro-inflammatorische Antwort des Immunsystems. Eine Störung im Immunsystem, bei der selbst harmlose Partikel als feindlich erkannt werden, kann zu einer chronischen Entzündung des Darms führen. Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 ist dabei wichtig, um eine Balance zwischen Immunantwort und Entzündungsreaktion aufrechtzuerhalten, indem es eine überschießende Reaktion des Immunsystems verhindert. Bei Tieren mit einer IL-10 Defizienz kommt es zu Th1-ähnlichen Immunantworten gegenüber der residenten Darmflora und folglich entwickeln sie eine spontane Kolitis (IBD = Inflammatory Bowel Disease) [181] [6] [213].

3.1 Das intestinale Immunsystem

3.1.1 Aufbau des GALT

Das Darm-assoziierte lymphoide Gewebe (GALT) ist unterteilt in Induktor- und Effektorstellen. Während die Effektoren Lymphozyten des Epithels und der mukosalen Lamina Propria sind, sind lymphoide Follikel für das Auslösen der Immunantwort verantwortlich. Mukosale lymphoide Follikel sind über die gesamte Länge des Darms verteilt. Sie können einzeln auftreten oder auch in Form von makroskopisch sichtbaren Aggregaten, den PP [122]. Die physikalische Barriere zum Darmlumen in den PP bildet das FAE. Eine Ausnahme sind spezialisierte Epithelzellen, die M (*microfold*)-Zellen. Diese nehmen gezielt Antigene auf und ermöglichen die Translokation von Mikroorganismen vom Darmlumen zur basolateralen Seite des Epithels [177]. Bei der Induktion einer Immunantwort werden die über die M-Zellen aufgenommenen Kommensalen an Dendritische Zellen (DCs) übergeben. Indem einige ihre Pseudopodien über das FAE ausstrecken, können sie zusätzlich Antigene direkt aus dem Lumen abfangen [163] [202]. Die aufgenommenen Bakterien werden meistens sofort vernichtet und die resultierenden Antigene den T-Zellen präsentiert, um eine spezifische Immunreaktion auszulösen.

Aufgrund der nahezu undurchdringlichen Epithel- und Mukusschicht sind für komplexe Antigene die M-Zellen der PP die wichtigsten Orte, um Zugang zum intestinalen Immunsystem zu erlangen. Die PP enthalten eine große Ansammlung an B-Zellfollikeln und dazwischen liegenden Bereichen mit T-Zellen und erinnern durch ihren Aufbau an Lymphknoten. Begrenzt werden sie zum intestinalen Lumen über das FAE mit den M-Zellen. Direkt darunter gelegen ist der Subepitheliale Dom (SED). Dieser enthält diffus verteilte Lymphozyten und Antigen-präsentierende Zellen (APC). Viele Pathogene, die auf dem oralen Weg infizieren wie *Yersinia ssp.*, *Shigella ssp.* und *Salmonella ssp.*, benutzen diese Route um in tiefere Gewebeschichten einzudringen und sich systemisch auszubreiten.

3.1.2 Unterscheidung zwischen Kommensalen und Pathogenen

Kommensale wie pathogene Mikroorganismen werden über ihre Strukturmotive, die MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*), von speziellen Mustererkennungsrezeptoren - (PRRs, *pattern recognition receptors*) wie den Toll-like Rezeptoren (TLR) [194] [8] oder den NOD-like Rezeptoren (NLR) erkannt [14] [3] [13]. Als potenter Auslöser einer Immunantwort gilt Flagellin, ein Strukturprotein des Flagellenapparates Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien und Ligand von TLR5 [216]. Lipopolysaccharid (LPS), eine Komponen-

te der äußeren Zellmembran und potenter Immunstimulator Gram-negativer Bakterien wird von TLR4 gebunden [146]. Dagegen werden Gram-positive Bakterien anhand ihrer Zellwandbestandteile Peptidoglykan und Lipoteichonsäure hauptsächlich über TLR2 erkannt. Insgesamt wurden bisher 10 TLRs im Menschen und 13 in der Maus beschrieben [147] [175]. Die Aktivierung der TLRs löst im Fall eines Pathogens in den betroffenen Zellen eine Signalkaskade über das Adaptormolekül MyD88 aus, die unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B führt. Dieser steuert die Expression pro-inflammatorischer Gene [192].

Es existieren verschiedene Theorien, warum es bei beiden Typen an Mikroorganismen zu gegensätzlichen Reaktionen kommt. In Frage kommen eine räumliche Trennung von Kommensalen (im Lumen) und den PRRs (an der basolateralen Seite der Epithelzellen) sowie verminderte Endotoxizität durch verändertes LPS (pentacyliertes Lipid A bei Gram-negativen Bakterien) oder modifiziertes Flagellin in Kommensalen. Des Weiteren kann das Toll-interagierende Wirtsprotein Tollip direkt inhibitorisch auf TLR2 und TLR4 wirken und führt somit zur negativen Regulation des TLR-Signalweges [218] [145]. Ebenso verhindert das Fehlen von Virulenzfaktoren bei den Kommensalen, dass sie aktiv in die Wirtszellen eindringen, das mukosale Gewebe kolonisieren oder sich systemisch ausbreiten können.

Das intakte Epithel verringert den Kontakt der residenten Bakterien mit dem intestinalen Immunsystem. Um eine orale Toleranz gegen eindringende Bakterien aufzubauen, werden über die M-Zellen der PP und über mit dem Epithel assoziierte Dendritische Zellen kontinuierlich Bakterien aus dem Lumen abgefangen. So konnten Rakoff-Nahoum et al. zeigen, dass kommensale Produkte die Expression zytoprotektiver und regenerativer Faktoren stimulieren [159]. Auf diese Weise können auch probiotische Bakterien, wie *Bacteroides vulgaris* und *E.coli* Nissle1917 (EcN) eine schützende Wirkung gegen nachfolgende Infektionen mit pathogenen Erregern entfalten. Ukena et al. zeigten, dass lebende EcN zum einen die Expression pro- und anti-inflammatorischer Moleküle aktivieren und somit eine protektive immunologische Barriere aufbauen [198] und zum anderen die Integrität der epithelialen Tight-Junctions verstärken und folglich das Eindringen in das Gewebe erschweren [197]. Die für die Ausbildung der Homöostase aufgenommenen Bakterien werden sofort von phagozytierenden Zellen vernichtet, um eine überflüssige verstärkte Immunantwort zu unterbinden.

Pathogene, welche die physikalische Barriere durchdringen, erhöhen die Permeabilität und zerstören zum Teil sogar das Epithel.

3.1.3 Immunreaktion gegenüber Kommensalen Bakterien

Die Immunreaktion gegenüber Kommensalen kennzeichnet sich durch die unvollständige Reifung Dendritischer Zellen nach Kontakt mit kommensalen Produkten oder Nahrungspartikeln und der Generierung von Th3 (T-Helfer3)-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Treg). Die Folge ist der Aufbau einer lokalen Immunantwort. Der Ablauf einer solchen Immunreaktion ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

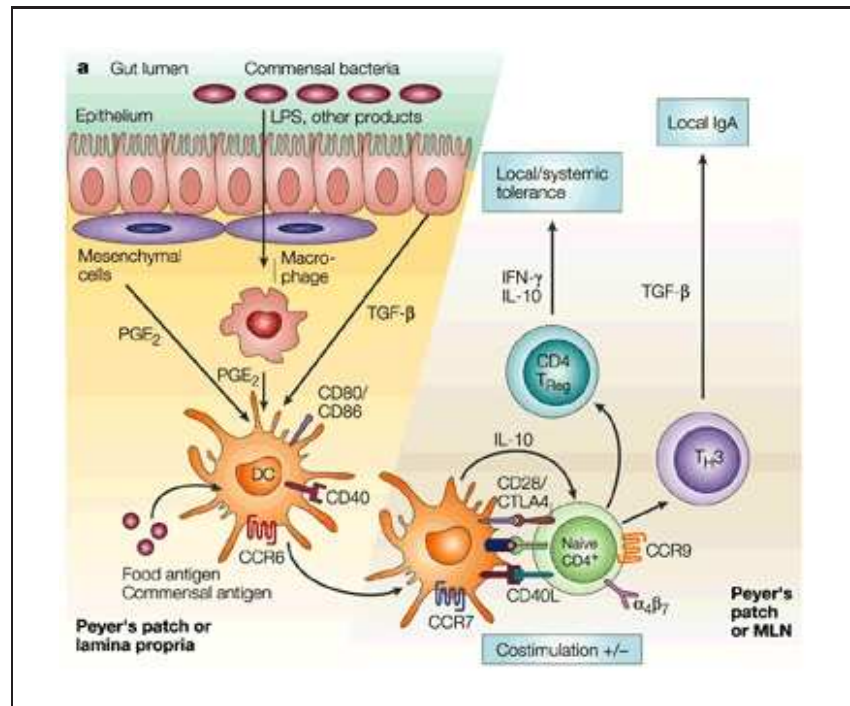


Abbildung 3.1: **Intestinale Immunantwort gegen Kommensale Bakterien oder Nahrungspartikel.** Als Reaktion auf kommensale Antigene werden DCs zu einer unvollständigen Reifung angeregt, welche die Polarisierung von T-Zellen in Richtung Th3 oder regulatorische T-Zellen bewirkt. Grafik adaptiert aus *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens*, Allan Mcl. Mowat, Nature Review 2003.

Kommensale oder andere Produkte werden von Dendritischen Zellen in den PP oder in der Lamina Propria aufgenommen. In Abwesenheit einer Entzündung werden durch das konstitutiv von Makrophagen und Mesenchymzellen ausgeschüttete Prostaglandin E2 (PGE₂) sowie durch TGF-β und eventuell auch IL-10 (welche von Epithelzellen produziert werden können) die DCs zur Reifung angeregt, die aber durch das Fehlen von potenten Entzündungsinduktoren unvollständig ist. PGE₂ ist ein starker Induktor von IL-10, welches proinflammatorische Th1-Antworten unterdrückt und somit die suppressorische Aktivität von PGE₂ auf die DC-vermittelte Immunantwort induziert [1]. Nach Wanderung der DCs in die

mesenterialen Lymphknoten oder auch noch in den PP präsentieren sie ihre Antigene nai-ven CD4⁺ T-Zellen. Diese differenzieren anschließend in Th3 oder Treg. Die Tregs produ-zieren IFN- γ und IL-10 und induzieren damit lokale intestinale Homöostase. Intestinale DCs induzieren nach Kontakt mit kommensalen Produkten eine protektive lokale IgA-Produktion [119].

3.1.4 Immunreaktion gegenüber Pathogenen

Die Immunreaktion gegenüber Pathogenen dagegen charakterisiert sich durch die vollstän-dige Reifung Dendritischer Zellen nach Kontakt mit bakteriellen Antigenen und der Eta-blierung einer pro-inflammatorischen Th1-Antwort oder einer anti-inflammatorischen Th2-Antwort. Der Ablauf einer solchen Immunreaktion ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

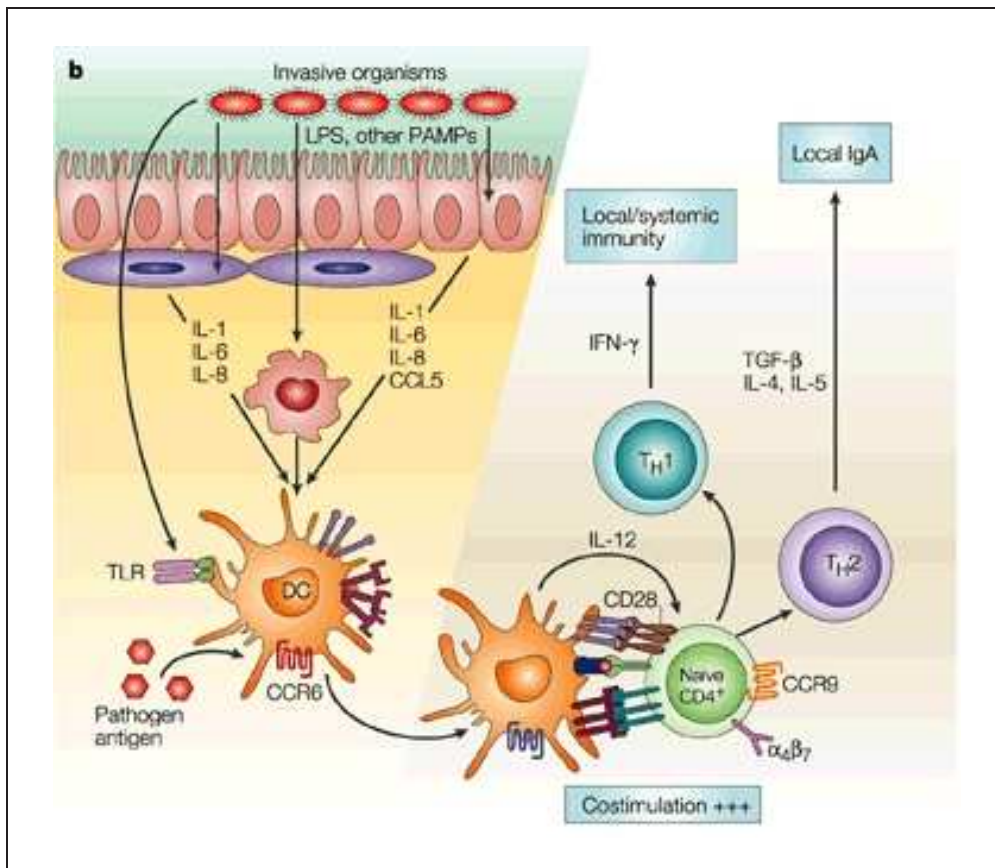


Abbildung 3.2: **Intestinale Immunantwort gegen Pathogene Erreger.** Als Reaktion auf pathoge-ne Antigene werden DCs zu einer vollständigen Reifung angeregt, welche die T-Zellen über IL-12 in Richtung einer pro-inflammatorischen Th1-Antwort polarisiert. Ebenso werden T-Zellen in die Th2-Richtung stimuliert. Grafik adaptiert aus *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens*, Allan Mcl. Mowat, Nature Review 2003.

Das Erkennen der MAMPs pathogener Erreger über die Toll-like Rezeptoren der Epithelzellen, Mesenchymzellen und Makrophagen induziert eine lokale Entzündungsreaktion. In diesem Fall reifen die DCs nach Aufnahme der Antigene vollständig und deren folgende Präsentation bewirkt die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen über das Zytokin IL-12 zu Th1 und über die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 zu Th2-Zellen. Während die Th1-Zellen IFN- γ produzieren und somit die Entzündungsreaktion verstärken, sezernieren Th2-Zellen IL-4 und induzieren IgA-Produktion. Dabei ist es von der Art der mikrobiellen Komponenten abhängig, in welche Richtung die DCs polarisiert werden. So führen die Proteine des Darmparasiten *Schistosoma mansoni* und des extrazellulären Bakteriums *Vibrio cholerae* zu einer Stimulierung myeloider DCs verstärkt in Richtung Th2. Im Fall des intrazellulären Bakteriums *Bordetella pertussis* und doppelsträngiger Virus-DNA dagegen vermehrt in Richtung Th1 [26]. Auch nach Infektionen mit *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) [161] [92] und *Toxoplasma gondii* [116] [56] konnte eine Th1 abhängige IFN- γ Sekretion in PP beobachtet werden. Das immunoregulatorische Zytokin spielt eine wichtige Rolle bei der Wirtsabwehr gegen intrazelluläre Parasiten, wie z.B. *Salmonella* Typhimurium indem es Makrophagen aktiviert und durch deren anti-mikrobielle Wirkung zur Abtötung der Salmonellen führt [89].

3.2 Virulenzfaktoren der Pathogene

Der Hauptgrund für die fehlende Entzündungsreaktion gegen Kommensalen des Darms könnte das Fehlen von Virulenzfaktoren sein. Um den Abwehrmechanismen des Wirts und den verschiedenen Umgebungen während des Infektionsverlaufs widerstehen zu können, besitzen Pathogene wie z.B. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) spezielle Virulenzfaktoren. *Salmonella* besitzt mindestens 60 solcher für die Virulenz benötigten Gene [62], von denen einige auch in nicht-pathogenen Stämmen von *E.coli* vorkommen. Diese werden hauptsächlich für Nährstoffbiosynthese, Transkriptionskontrolle und DNA-Reparatur benötigt [62]. Neben diesen Faktoren verwendet *Salmonella* Typhimurium zwei Typ-3-Sekretions-systeme (T3SS) [83], um in nicht-phagozytierende Wirtszellen einzudringen (SPI-1; *Salmonella* Pathogenitätsinsel-1), in Phagozyten überleben und sich systemisch ausbreiten zu können (SPI-2). Einige der Virulenzfaktoren können direkt pro-inflammatorische Signalwege aktivieren. Die bei der Interaktion der Salmonellen mit den Epithelzellen über das T3SS translozierten SPI-1 Proteine SipA, SopA, SopB, SopD, SopE und SopE2 führen zu einer erhöhten Flüssigkeitsansammlung und Neutrophilen-Infiltration. Zum Beispiel induziert SipA die Produktion von Chemoattraktanten, welche die transepitheliale Migration der Neutrophilen (PMN) fördern. SopB und SopE2 aktivieren intrazelluläre Signalwege, welche zur Expression pro-inflammatorischer Zytokine führen [71] [221] [111]

[82]. Der von *Salmonella* auf der Pathogenitätsinsel 1 (SPI-1) kodierte Virulenzfaktor SipB vermittelt unter anderem die Aktivierung der Caspase-1, um die PP kolonisieren zu können [132]. Dieses Enzym spaltet die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 in ihre bioreaktive Form, die zur Rekrutierung von PMN führt [117] [132] [199] [30]. Ebenso wie SipB aktiviert auch das Shigellenprotein IpaB die Caspase-1 mit nachfolgender Hydrolyse von IL-1 β und IL-18 in ihre reife Form. Dieser Aktivierungsprozess nach Kontakt mit mikrobiellen Peptiden findet im Inflammasom von Makrophagen und Neutrophilen statt. Das Inflammasom ist ein Komplex von Proteinen mit speziellen Funktionen in der frühen Immunabwehr [31]. Dazu gehören unter anderem die PRRs und Caspase-1, welche bei Aktivierung des Proteinkomplexes, durch Ligandenbindung an den PRR, selbst aktiviert wird und Pro-Interleukin-1 β in seine aktive Form spaltet und somit eine pro-inflammatorische Reaktion mit PMN Infiltration auslöst.

Salmonellen mit Defekten in den Regulatoren HilA, PhoP oder InvA können im Gegensatz zum Wildtyp keine Migration von PMN über das intestinale Epithel bewirken [128]. Im Weiteren induziert das Protein HP-NAP von *Helicobacter pylori* die Produktion von Sauerstoffradikalen in humanen PMN. EspA der enteropathogenen *E.coli* (EPEC)-Spezies erhöht die Sekretion von IL-1 β und IL-6 über das Epithel.

Als Folge des Eindringens pathogener Erreger kommt es direkt zur Zerstörung von Wirtszellen und umliegender Gewebe. Neben der Aktivierung von IL-1 β und IL-18 induziert die Caspase-1 eine spezielle Form der Apoptose von Wirtszellen, wodurch zahlreiche toxische Substanzen, wie Sauerstoffradikale, Stickoxide, Proteasen und Peroxidasen frei werden, welche die Epithelbarriere schädigen. Die transepitheliale Migration rekrutierter PMN fördert ebenso die Destabilisierung dieser Barriere [59] [127] [151] [174]. Auch die Urease von *H. pylori* wird mit Apoptose-Induktion und Aktivierung von Neutrophilen und Monozyten in Verbindung gebracht [40] [73]. Dieses Enzym ist ein wichtiger Kolonisierungsfaktor, der Harnstoff in das für die Magenschleimhaut toxische Ammonium spaltet [125]. Als Induktor für die Produktion weiterer pro-inflammatorischer Mediatoren gilt das Zytokin IL-1 α . Es wird bei der Invasion des Epithels oder der PP durch enteropathogene Bakterien wie *Shigella flexneri*, *Clamidia trachomatis* oder *Yersinia enterocolitica* freigesetzt und führt zu einer starken Entzündung des Gewebes. So führt die Translokation von Yop-Effektorproteinen über die Typ-3-Sekretionssysteme von *Yersinia* zur Zerstörung von Epithelzellen und der Apoptose von Makrophagen. Dabei wird die Produktion von IL-1 α induziert, welches wiederum die Sekretion von Chemoattraktanten für Neutrophile (IL-8, MCP-1 und GM-CSF) auslöst [90] [162] [176].

3.3 IL-10 und seine Rolle bei der Immunantwort

3.3.1 Das Zytokin IL-10

Entdeckt wurde IL-10 über seine Funktion, eine pro-inflammatorische Th1-Antwort zu inhibieren [47]. Später wurde sein Aktivitätsrepertoire auf Th2-Zellen erweitert [212]. Des Weiteren spielt es eine wichtige Rolle in der Ausbildung regulatorischer T-Zellen und somit in der Etablierung einer mukosalen Toleranz [206]. Erstmals isoliert von Th2-Zellen wird das immunsuppressive Zytokin darüber hinaus von Epithelzellen, Keratinozyten und vor allem von den meisten Zelltypen der hämatopoetischen Zelllinie gebildet. Dazu gehören Dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten (T- und B-Zellen) [135]. Die Transkriptionsregulation von IL-10 erfolgt über Sp1 und Sp3, die beide konstitutiv exprimiert werden [195]. Das lässt eine Basisexpression von IL-10 in den genannten Zelltypen vermuten.

Das von Th1-Zellen produzierte IL-10 dient bei einer Entzündungsreaktion als selbstregulierende Rückkopplungsschleife, um Schädigungen am Gewebe durch eine übertriebene Entzündungsreaktion zu limitieren [54]. So können gereifte DCs über die Produktion von autokrin wirkendem IL-10 die Th1-Antwort abschwächen [20]. Die anti-inflammatorische Wirkung von IL-10 liegt in der Inhibierung aktivierter Makrophagen/Monozyten und Dendritischer Zellen durch Verhindern der Antigenpräsentation über MHCII-Komplexe und der Zytokin-Sekretion [28] [48] [118].

3.3.2 Der IL-10 Rezeptor

Der IL-10 Rezeptor ist aus zwei Untereinheiten aufgebaut: IL-10R1 und IL-10R2. Für die spezifische Bindung des Liganden ist IL-10R1 verantwortlich. Nach Aktivierung des IL-10R-Komplexes führt IL-10R2 die beiden Untereinheiten zusammen und aktiviert wiederum eine Signalkaskade über JAK/STAT3 die zur Expression der STAT3-kontrollierten Gene führt [46] [208] [168]. Die über STAT3 aktivierten Gene blockieren pro-inflammatorische Gene, deren Expression z.B. nach Kontakt der TLR mit Antigenen, über einen MyD88-Signalweg eingeleitet wurde. Die Inhibierung der Makrophagenproliferation und Zytokinproduktion kann zusätzlich über einen STAT3 unabhängigen Signalweg ablaufen [43].

Im Gegensatz zu IL-10R1 ist die IL-10R2 Untereinheit nicht einzigartig, sondern auch die 2. Untereinheit der Rezeptoren anderer Klasse II-Zytokine, wie IL-22, IL-26 und IFN- λ [29]

[45]. Der IL-10 Rezeptor befindet sich auf der Oberfläche der meisten Zelltypen der hämatopoetischen Zelllinie sowie von Epithelzellen und Keratinozyten [135] [27]. Dazu gehören Dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten (T- und B-Zellen) [135].

3.3.3 Bedeutung von IL-10 bei Infektionen und IBD

Dass IL-10 die pro-inflammatorische Th1-Antwort abschwächt, wird auch in der erhöhten Immunreaktion und folglich schnelleren Beseitigung einer Infektion mit pathogenen Erregern wie z.B. *Leishmania* nach Neutralisierung des Zytokins sichtbar [214] [138]. Nachteile einer solchen verstärkten Immunreaktion sind jedoch immunopathologische Schädigungen am Gewebe, welche wie im Fall von Infektionen mit *Toxoplasma gondii* oder *Trypanosoma cruzi* [85] letal enden können. In diesen Fällen sterben die Mäuse durch Überproduktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-12, IFN- γ und TNF- α [57]; [84]. Die Injektion mit rekombinantem IL-10 oder die Überexpression von IL-10 in transgenen Mäusen verringert die Immunopathologie gegenüber einer Infektion mit einer Vielzahl an Pathogenen [135]. Das anti-inflammatorische Zytokin verlangsamt die Bekämpfung einer Infektion, bewirkt somit jedoch einen Schutz vor chronischen Entzündungen, verursacht durch eine Überreaktion des Immunsystems.

Kommensale Bakterien, welche die intestinale epitheliale Barriere durchdringen, werden umgehend von den myeloiden DCs im subepithelialen Dom vernichtet. Die myeloiden Dendritischen Zellen sind die einzige Untergruppe der DCs die IL-10 sekretieren [87]. Dieses hat durch seine autokrine Wirkung eine regulatorische Bedeutung in der Selbstkontrolle [20]. Vermutlich kann nur durch diesen Prozess gewährleistet werden, dass es nicht zu einer kontinuierlichen Aktivierung des Immunsystems kommt.

IL-10 defiziente Mäuse (IL10^{-/-}) entwickeln eine mit der humanen IBD (Inflammatory Bowel Disease) vergleichbare chronische Entzündung des Darms [104]. Diese Enterokolitis kennzeichnet sich histologisch durch Ulzerationen und Einwanderung einer Vielzahl an Immunzellen, begleitet von einer Hyperplasie des Epithels [105]. Es gibt viele Indizien dafür, dass neben Umweltfaktoren die endogene Darmflora bei der Etablierung einer Enterokolitis eine entscheidende Rolle spielt. So bildet sie sich zumeist am Ileum, Caecum und Kolon aus, wo die Bakteriendichte am höchsten ist [120]. Keimfreie IL10^{-/-} Mäuse entwickeln keinerlei Anzeichen einer IBD. Verglichen mit konventionell gehaltenen IL10^{-/-} Tieren etablieren sie unter spezifisch Pathogen-freien (SPF) Haltungsbedingungen eine schwächer ausgeprägte Enterokolitis mit verzögertem Ausbruch [105]. Über Kolonisierung mit bestimmten Bakterienspezies, wie z.B. *Helicobacter hepaticus*, kann die Ausbildung einer Kolitis in SPF-Mäusen beschleunigt werden [108]. Die Besiedlung von keimfreien IL10^{-/-} Mäusen mit aus-

gewählten endogenen Bakterien führt ebenfalls zur Ausbildung einer Kolitis, unabhängig vom Zeitpunkt der Assoziierung [193]. Als Hypothese für die Entstehung der Enterokolitis wird eine dysregulierte Th1 Immunantwort gegen die luminale Darmflora angeführt. Die Analyse von Mausmutanten mit gezieltem *knock-out* von IL-10 nur in T-Zellen zeigte, dass diese Hauptproduzenten von IL-10 während einer Kolitis sind [169]. Außerdem konnten Karrasch et al. eine entscheidende Rolle des über TLR aktivierten NFkB Signalsweges nachweisen [94] [93] [173].

3.4 Zielsetzung der Arbeit

Ein detailliertes Verständnis für den Ablauf einer Infektion und der Interaktion zwischen dem betroffenen Wirt und dem Erreger ist notwendig, um diese Infektionen bekämpfen zu können. Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 spielt eine wichtige Rolle während der adaptiven Immunität, um die Etablierung einer chronischen Entzündung gegenüber den residenten Mikroorganismen des Darms zu verhindern. In diesem Prozess konnte vor allem die Bedeutung von T-Zell-produziertem IL-10 nachgewiesen werden. Die Rolle von IL-10 bei der adaptiven Immunantwort ist schon detailliert beschrieben, unklar ist jedoch seine Funktion für das angeborene Immunsystem, also in der frühen Unterscheidung zwischen feindlichen und nützlichen Bakterien. In dem ersten Teilprojekt sollte deshalb ein Infektionsmodell etabliert werden, um die Rolle von IL-10 bei der frühen angeborenen Immunantwort im Darm zu untersuchen, sowie die Faktoren zu identifizieren, welche auf der Seite des Wirts und des Pathogens dabei wesentlich sind. Als Infektionsmodell wurde das Modellpathogen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ausgewählt, da die Virulenzfaktoren dieses fakultativ intrazellulären Pathogens bereits detailliert charakterisiert sind und die klinische Bedeutung der *Salmonella*-Spezies in Salmonellosen und Typhus sehr hoch ist. Durch das gezielte Ausschalten von Virulenzfaktoren sollten avirulente Formen von *Salmonella* Typhimurium erzeugt werden, um essentielle Faktoren bei der Induktion einer von IL-10 regulierten Immunantwort identifizieren zu können. Des Weiteren sollten durch verschiedene zelltypspezifische *knock-outs* von IL-10 bzw. seines Rezeptors die entscheidenden Zelltypen während des Prozesses der frühen Immunantwort bestimmt werden.

4. Ergebnisse

Mäuse, denen das immunsuppressive Zytokin IL-10 fehlt, entwickeln eine chronische Entzündung des Darms (IBD) in Reaktion auf die residente Darmflora. In einem zelltypspezifischen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass speziell von T-Zellen gebildetes IL-10 für die adaptive Immunantwort von ausschlaggebender Bedeutung ist [169]. Ebenso spielt das Erkennen bestimmter bakterieller Faktoren, wie das LPS Gram-negativer Bakterien als auch Flagellen eine Rolle bei der Induktion einer Kolitis. Sie werden vom Immunsystem unter anderem über die Toll-like Rezeptoren 4 (LPS) beziehungsweise 5 (Flagellin) erkannt [75] [217] [204]. In diesem Projekt sollte die Rolle von IL-10 bei der frühen angeborenen Immunantwort untersucht werden. Dabei sollte mit Hilfe des Modellpathogens *Salmonella* Typhimurium ein Infektionsmodell etabliert werden, um Faktoren zu analysieren, die für die Induktion einer angeborenen Immunreaktion im Darm von Bedeutung sind.

4.1 Etablierung eines *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Infektionsmodells

Um die Bedeutung von IL-10 untersuchen zu können, wurden IL-10 defiziente Tiere im C57BL/6J genetischen Hintergrund verwendet. Die am Helmholtz Zentrum gehaltenen Tiere sind mit einer definierten Darmflora besiedelt, der sogenannten Charles River Altered Schaedler Flora (CRASF®). Dazu gehören 8 Spezies, unter anderem *Lactobacillus acidophilus*, *Bacteroides distasonis* und *Streptococcus faecalis*, jedoch keine *Escherichia coli*-Spezies. Zelltypspezifische *knock-outs* von IL-10 und dem IL-10 Rezeptor ermöglichten die Analyse über den Hauptproduzenten und rezipienten des IL-10 Signals während dieses Prozesses.

Auf der Seite der Bakterien sollte durch gezielte Inaktivierung die Wirkung definierter *Salmonella*-Virulenzfaktoren auf die IL-10 vermittelte frühe angeborene Immunantwort untersucht werden.

4.1.1 Infektionen mit *Salmonella* Typhimurium

Salmonella Typhimurium ist ein naher Verwandter des hauptsächlich als Kommensalen vorkommenden *E. coli*, aber im Gegensatz zu diesem ein typischer Vertreter enterischer Pathogene. Oral verabreicht induziert *Salmonella* Typhimurium im Darm einer C57BL/6J-Maus eine Entzündungsreaktion, die sich innerhalb von 7 Tagen systemisch verbreitet und zum Tod führt. Eine $\Delta aroA$ Mutante von *S. Typhimurium* (Defekt in der Chorismat Biosynthese) [80] führt auch bei einer höheren Infektionsdosis lediglich zu einer transienten, selbst-limitierenden Infektion ohne klinische Symptome, welche praktisch auf den Darm begrenzt bleibt. Die frühe Immunreaktion entspricht der einer Wildtyp-*Salmonella* Typhimurium-Infektion [70].

Wird zusätzlich zu der $\Delta aroA$ Mutation das *asd*-Gen ausgeschaltet, lysieren die Zellen während des nächsten Teilungsprozesses, da sie nicht in der Lage sind, eine Zellwand zu bilden. *In vitro* kann der Genverlust durch Zugabe von Diaminopimelinsäure (DAP) ins Medium komplementiert werden (Abb. 4.1). Im Darm jedoch ist kein DAP verfügbar, deshalb überleben die Bakterien dort nur wenige Stunden. Diese Mutante war die Grundlage für weitere Salmonellenmutanten, die generiert wurden, um für die Einleitung einer Immunreaktion relevante bakterielle Faktoren zu finden.

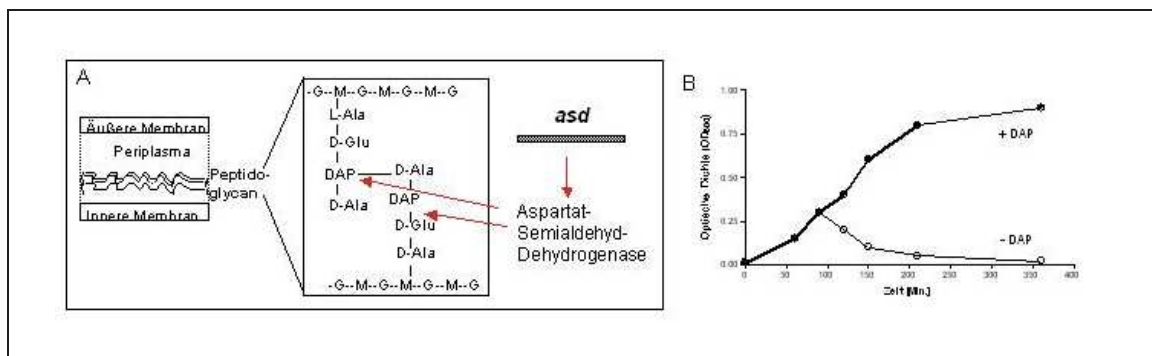


Abbildung 4.1: **Zellwandaufbau Gram-negativer Bakterien und Wachstumskurve von SL1344 $\Delta aroA \Delta asd \pm DAP$.** (A) Aufbau der Zellwand von Gram-negativen Bakterien. DAP (Diaminopimelinsäure) ist ein wichtiger Bestandteil der Zellwand. Das Gen *asd* kodiert für eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, welche für die Herstellung von DAP benötigt wird. (B) Die Wachstumskurve von SL1344 $\Delta aroA \Delta asd$ zeigt, dass die Bakterien ohne eine Zellwand absterben, die Zugabe von DAP komplementiert den Verlust des vom *asd*-Gen kodierten Proteins.

Diese Mutante sowie deren Derivate wurden IL-10 defizienten Mäusen und Wildtypmäusen intra-gastrisch appliziert (5×10^{10} KBE). Für die Analyse der frühen Immunantwort wurden

die Tiere zumeist einen Tag nach der Infektion (d1 p.i.) getötet und die Entwicklung einer Entzündungsreaktion in den PP des Dünndarms untersucht.

4.1.2 Entzündungsmarker und Versuchsaufbau

Um die Zellpopulationen zu charakterisieren, die während einer frühen Entzündungsreaktion gegen *Salmonella* in die PP einwanderten, wurden durchflusszytometrische (FACS) Analysen mittels FACSCalibur durchgeführt. Der erste Schritt einer Immunreaktion ist die Rekrutierung polymorphkerniger Granulozyten (PMN, CD11b^{hi}, Ly6G^{hi}, Ly6C^{me}) und mobiler Makrophagen (CD11b^{hi}, Ly6G^{low}, Ly6C^{hi}). Der Influx an PMN diente somit als Indikator für die Initiierung einer frühen Immunantwort des Wirtes in Reaktion auf die Infektion.

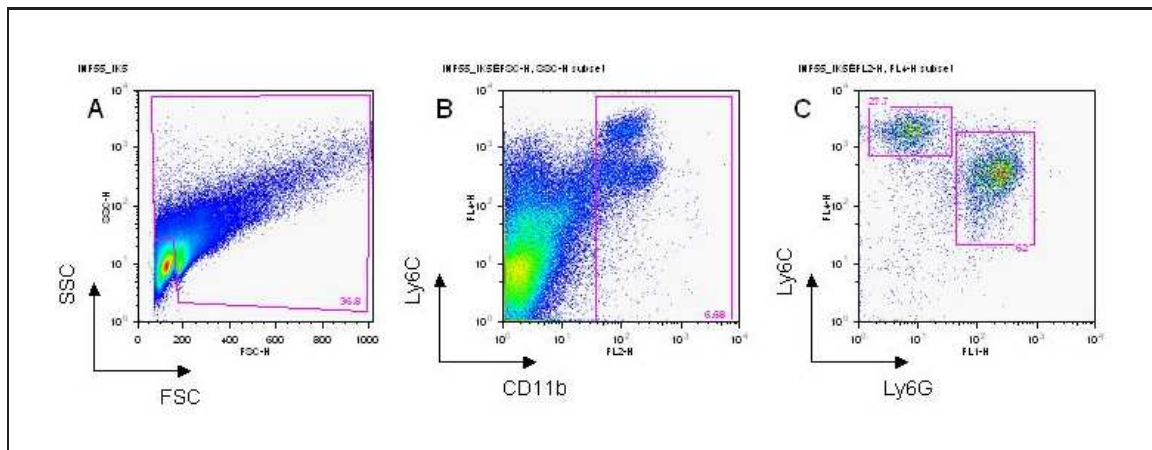


Abbildung 4.2: Durchflusszytometrische Analysen der Zellpopulationen in den PP. Im FACS wurden die Zellen (Antikörperfärbung siehe Material und Methoden) als erstes hinsichtlich ihrer Größe und Granularität (SSC und FSC) analysiert, wobei Zelltrümmer durch ihre geringe Größe und niedrige Granularität ausgeschlossen werden konnten (A). Die verbliebenen Zellen wurden auf CD11b^{hi} eingegrenzt (B). Letztlich konnten aus dieser Population die Ly6G^{hi} (PMN) und Ly6C^{hi} (Makrophagen) Zellen bestimmt (C) und deren prozentualer Anteil an den Gesamtzellen ermittelt werden.

Anhand der aus den FACS-Daten ermittelten prozentualen Anteile der PMN und der Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Neubauerzählkammer, konnte die absolute Zahl an PMN errechnet werden. Die Infiltrationsrate (Influx) ergab sich aus dem Quotienten der PMN-Zahl infizierter Mäuse und dem Mittelwert der uninfizierten Kontrolltiere (naiv).

Für immunhistochemische Analysen wurde die Hälfte der PP für Kryotomschnitte eingebettet, anschließend mit Antikörpern gegen Salmonellen-LPS und Ly6G (PMN) gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

Die Abb. 4.3 zeigt eine Übersicht des Versuchsaufbaus.

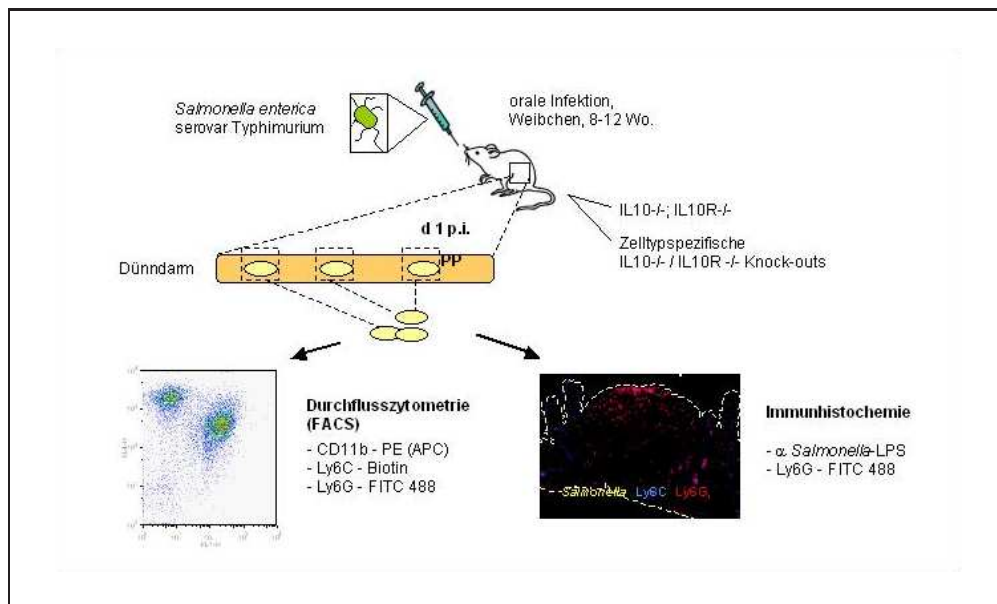


Abbildung 4.3: **Experimenteller Aufbau des *Salmonella* Typhimurium Infektionsmodells.** IL-10 defiziente (*IL10^{-/-}*) und IL-10 Rezeptor defiziente (*IL10R^{-/-}*) weibliche Mäuse im Alter von 8 -12 Wo. wurden oral mit 5×10^{10} KBE von verschiedenen Mutanten von *Salmonella* Typhimurium SL1344 infiziert. An Tag 1 nach der Infektion (d1 p.i.) wurden die PP des Dünndarms isoliert und eine Zellsuspension (Methoden Teil 1) hergestellt. Die Infiltration durch Entzündungszellen der PP wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Teilweise wurden die PP für Kryotomschnitte eingebettet und nach Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Salmonellen-LPS und Ly6G (PMN) fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

4.1.3 Validierung des Infektionsmodells

Um zu überprüfen, ob dieses Modell für die Untersuchung der IL-10 regulierten frühen Immunantwort geeignet ist, wurde IL-10 defizienten Mäusen sowie C57BL/6J Kontrolltieren eine hohe Dosis an SL1344 $\Delta aroA \Delta asd$ (5×10^{10} KBE) intragastrisch appliziert. An Tag 1 nach der Infektion wurde der Neutrophileninflux in den PP mittels FACS-Analyse bestimmt.

ERGEBNISSE

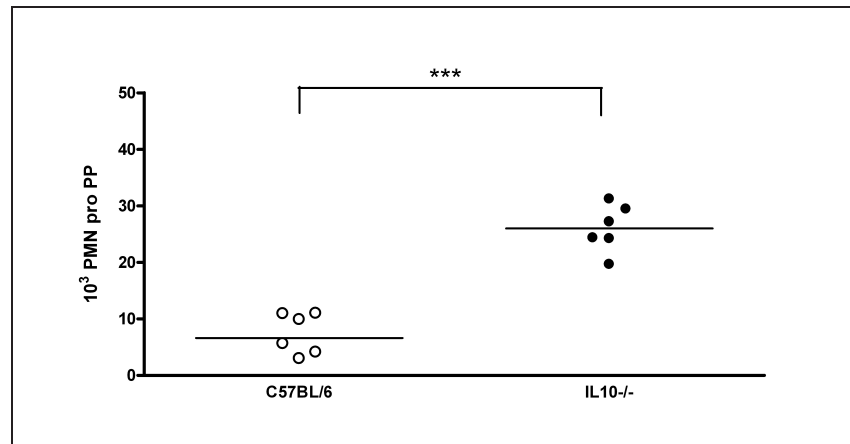


Abbildung 4.4: **Orale Infektion von C57BL/6J und IL10^{-/-} mit SL1344 Δ aroA Δ asd.** C57BL/6J und IL10^{-/-} Mäuse wurden oral mit 5×10^{10} SL1344 Δ aroA Δ asd infiziert. Die Bestimmung der Zahl der PMN mittels FACS erfolgte an d1 p.i.. Sichtbar ist eine signifikante Erhöhung der PMN-Zahl in IL10^{-/-} gegenüber den Kontrollen. Das Ergebnis ist repräsentativ für 3 Versuche. *** P<0,001. MannWhitney U-Test.

Die Infektion mit schnell sterbenden SL1344 Δ aroA Δ asd führte in IL-10 defizienten Tieren zu einem erhöhten Influx an Neutrophilen. Durch den Verlust des anti-inflammatorischen Zytokins scheinen diese Tiere schlechter in der Lage zu sein, eine Entzündungsreaktion zu kontrollieren, auch wenn der infektiösauslösende Erreger vernichtet ist.

4.2 Kinetik einer *S. Typhimurium* Δ aroA Δ asd Infektion in IL10^{-/-} Mäusen

Um die Rolle des Interleukins während der frühen angeborenen Immunantwort in den PP IL-10 defizienter Mäuse genauer zu charakterisieren, wurden verschiedene frühe Zeitpunkte nach der Infektion mit der attenuierten *Salmonella* Typhimurium-Mutante SL1344 Δ aroA Δ asd analysiert. Drei Stunden (3h), 1 Tag (d1) und 2 Tage (d2) nach der Infektion (p.i.), sowie von nicht infizierten Tieren (naiv), wurden die PP isoliert und mittels FACS der PMN Influx bestimmt.

ERGEBNISSE

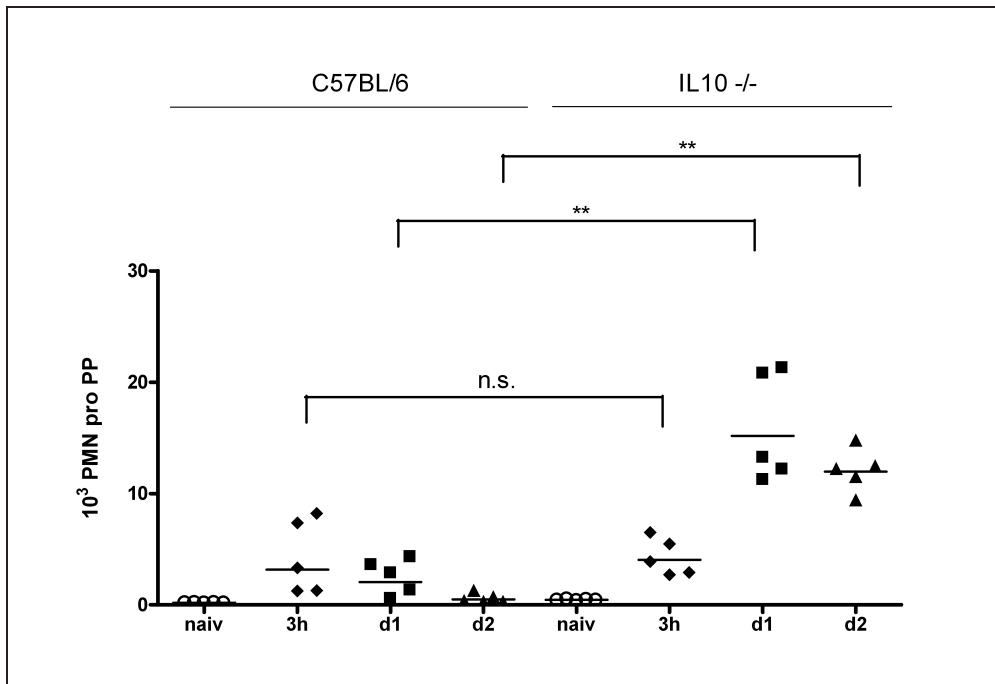


Abbildung 4.5: **Kinetik einer SL1344 Δ aroA Δ asd Infektion von C57BL/6J und IL10^{-/-}.** C57BL/6J und IL10^{-/-} Mäuse wurden oral mit 5×10^{10} SL1344 Δ aroA Δ asd infiziert. Die Bestimmung der Zahl der PMN mittels FACS erfolgte nach 0h (naiv), 3h, d1 und d2. Alle Zeitpunkte sind signifikant erhöht gegenüber uninfizierten Kontrollen. Das Ergebnis ist repräsentativ für 3 Versuche. ** $P < 0,005$, n.s.: nicht signifikant. MannWhitney U-Test.

Die Infektion mit SL1344 Δ aroA Δ asd führte in den IL10^{-/-} Tieren nach 3h zu einem Anstieg der Zahl der PMN, der dem in C57BL/6J Kontrolltieren glich. Während in den C57BL/6J Wildtypmäusen die Entzündungsreaktion anschließend wieder herunterreguliert wurde, so dass die Zahl an PMN an Tag 1 niedriger war als nach 3h und an Tag 2 nahezu auf dem Niveau der uninfizierten Tiere, zeigten die IL10^{-/-} Mäuse eine weitere signifikante Zunahme an PMN an Tag 1, die ungefähr 15 mal höher war als bei naiven Tieren. Erst an Tag 2 nahm die Zahl an PMN langsam ab. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass IL-10 während der frühen Immunantwort die Entzündungsreaktion begrenzt.

Immunhistochemische Analysen der PP von IL10^{-/-} Tieren zeigten, dass 3h p.i. PMN und Salmonellen im Domareal der PP lokalisiert waren. Bis d1 p.i. kam es zu einer massiven PMN-Infiltration in den Interfollikulären Regionen (IFR). Zu diesem Zeitpunkt konnten weder in der Domregion noch in den IFR Salmonellen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Keimzahlbestimmungen [210].

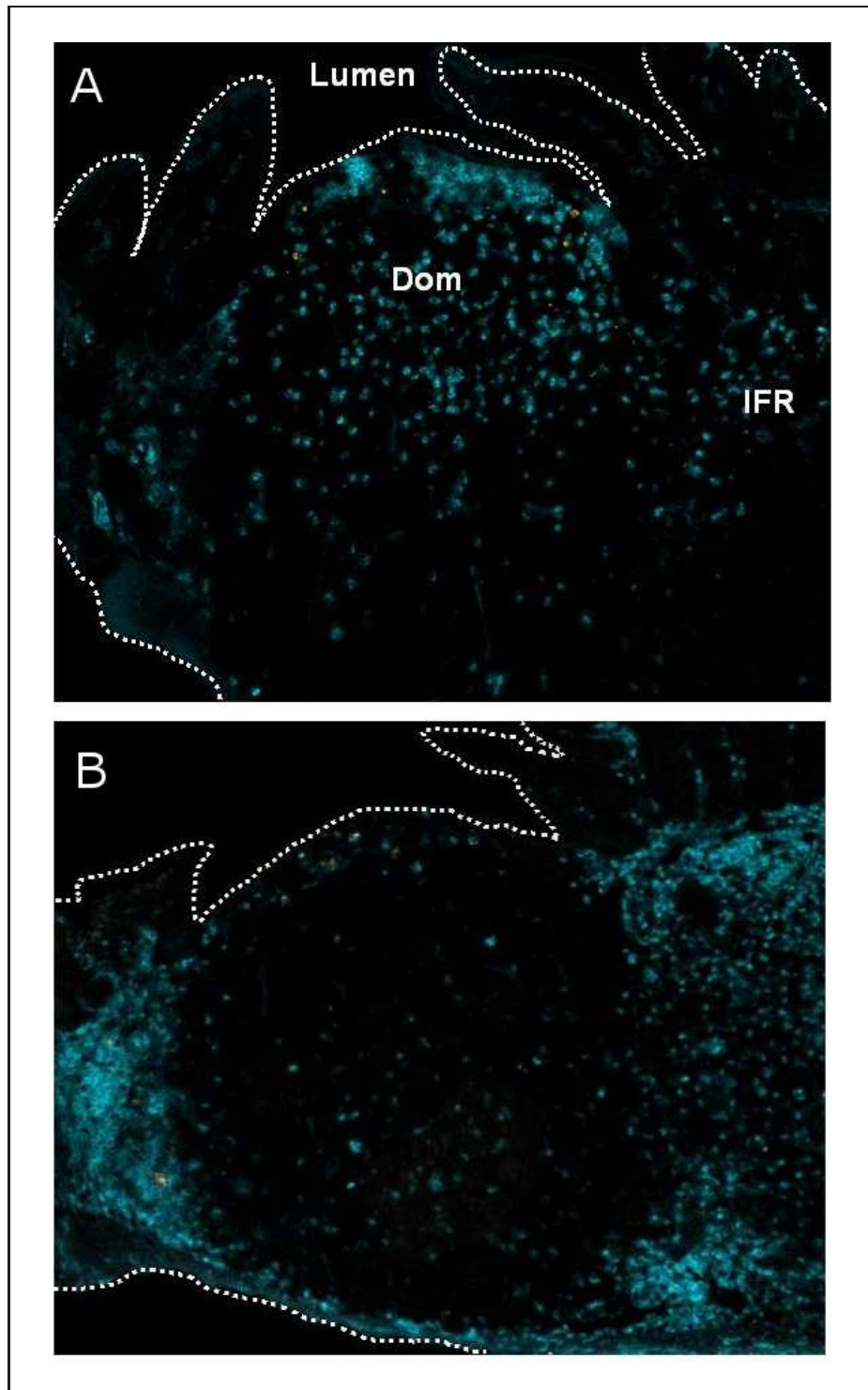


Abbildung 4.6: **Lokalisation von SL1344 Δ aroA Δ asd (Gelb) und PMN (Cyan) in PP von IL10-/- nach 3h (A) und d1 p.i. (B).** Antikörperfärbung von 8 μ m dicken Kryotomschnitten von 5×10^{10} SL1344 Δ aroA Δ asd infizierten IL10-/- mit Anti-*Salmonella*-LPS und Ly6G (PMN). (A) 3h p.i. waren nur wenige PMN im Dom des PP erkennbar. (B) d1 p.i. waren keine Salmonellen detektierbar, aber eine hohe Zahl an PMN in den interfollikulären Regionen des PP. IFR: Interfollikuläre Region.

Das Modell zeigte, dass für die Begrenzung einer Entzündungsreaktion nach der Induktion IL-10 entscheidend ist. Somit kann es für die Untersuchung bakterieller und wirtszellspezifischer Faktoren, die für IL-10 regulierte Prozesse der Entzündungshemmung von Bedeutung sind, genutzt werden. Die Analyse der Neutrophilenzahl in den PP erfolgte dabei an Tag 1 nach oraler Infektion, dem Zeitpunkt an dem der maximale Unterschied zwischen IL10^{-/-} und Wildtyptieren gezeigt wurde.

4.3 Bakterielle Faktoren, die eine starke durch IL-10 regulierte angeborene Immunantwort auslösen

Das hier etablierte Infektionsmodell sollte verwendet werden, um bakterielle Faktoren zu identifizieren, die eine IL-10 abhängige Entzündungsreaktion auslösen. Dazu wurde zunächst die Reaktion auf eine Infektion mit einer hohen Dosis eines Kommensalen untersucht. Die hohe Infektionsdosis bewirkt, dass auch dieser in die PP gelangt. Im Gegensatz zu einem virulenten Pathogen ist er jedoch nicht fähig zu kolonisieren. Den residenten Darmbakterien fehlen die dafür notwendigen Virulenzfaktoren. Jedoch gibt es auch einige Gemeinsamkeiten zwischen den Gram-negativen Darmbakterien und einem Pathogen, wie *Salmonella*. Das sind einige Oberflächenstrukturen, wie z.B. das LPS und Flagellen. Um die Rolle einiger dieser Faktoren näher zu charakterisieren, wurden Mutanten im Hintergrund von SL1344 $\Delta aroA \Delta asd$ generiert, welche spezifische Deletionen in ausgewählten Genen tragen.

4.3.1 Infektion von IL10^{-/-} mit dem Probiotikum *E. coli* Nissle 1917 (EcN)

Salmonellen sind sehr nah verwandt mit *E. coli*. Die wichtigsten Unterscheidungsmerkmale sind die Virulenzfaktoren, welche im Vergleich nur die Salmonellen besitzen und sie somit zu einem Pathogen machen.

E. coli Nissle 1917 (EcN) ist ein probiotischer *E. coli*, der kommerziell unter dem Namen Mutaflor® erhältlich ist und sowohl prophylaktisch als auch zur Behandlung von gastrointestinalen Beschwerden, protrahierter Diarrhö oder chronischen Darmerkrankungen angewandt wird [102]. Als Gram-negativer Kommensale besitzt *E. coli* Oberflächenmoleküle wie LPS, die von den Toll-like Rezeptoren erkannt werden, aber trotzdem wird dieses Bakterium wie auch andere Kommensale im Darm toleriert. Eine mögliche Erklärung dafür wäre,

dass diese Bakterien im Gegensatz zu den Pathogenen anti-inflammatorische Faktoren induzieren. Mit dem hier entwickelten Infektionsmodell sollte untersucht werden, ob IL-10 - als immunsuppressives Zytokin - dabei eine entscheidende Rolle spielt.

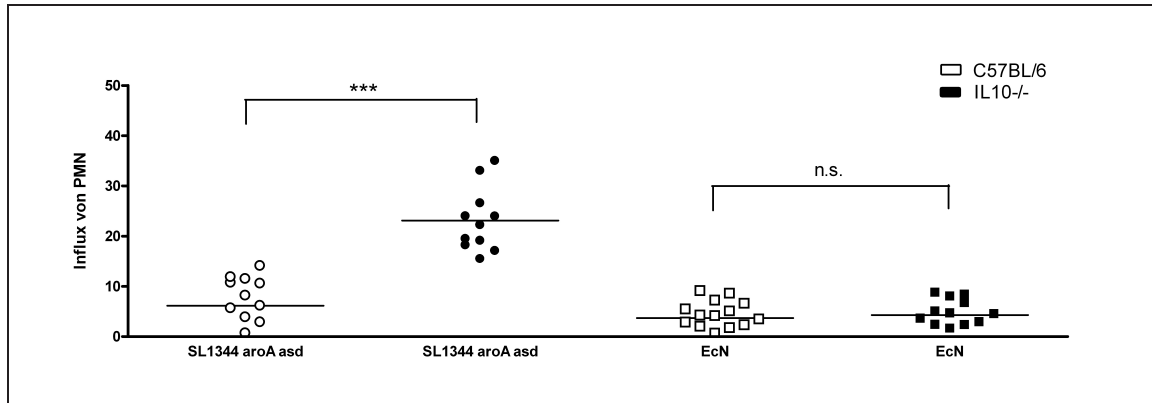


Abbildung 4.7: Infektion von IL10^{-/-} mit EcN und SL1344 Δ aroA Δ asd als Kontrolle. PMN-Infiltration in PP von IL10^{-/-} und C57BL/6J-Tieren an d1 nach Infektion mit 5×10^{10} SL1344 Δ aroA Δ asd, oder 5×10^{10} *E. coli* Nissle 1917 (EcN). EcN zeigt nach der Infektion in IL10^{-/-} keinen mit SL1344 Δ aroA Δ asd in IL10^{-/-}-vergleichbaren PMN Influx. Ergebnisse aus 3 Versuchen zusammengefasst. *** P<0,001, n.s.: nicht signifikant. MannWhitney U-Test.

Wie schon Yvonne Willer [210] zeigen konnte, löst EcN auch in Wildtypmäusen einen vierfach erhöhten Influx an PMN aus, wenn auch nicht so stark wie der Kontrollsalmonellenstamm (7x). Dies widerspricht der allgemeinen Erwartung, dass Kommensale und insbesondere probiotische Bakterien keine Immunreaktion im Wirt auslösen sollten. Wichtig ist jedoch, dass EcN nicht in der Lage war, in IL10^{-/-} eine im Vergleich zu den C57BL/6J-Kontrollen erhöhte Infiltration von PMN zu bewirken. Faktoren, die *Salmonella* von *E. coli* unterscheiden, könnten bei der von IL-10 regulierten Entzündungsreaktion eine Rolle spielen.

4.3.2 Infektion von IL10^{-/-} mit SL1344 Δ aroA Δ asd, die zuvor mit Formaldehyd bzw. Gentamycin behandelt wurden.

Die vorherigen Ergebnisse zeigten, dass möglicherweise von den Salmonellen produzierte Virulenzfaktoren für das Auslösen der Immunantwort verantwortlich sind. Um diese Hypothese zu testen wurden die Salmonellen für eine Stunde mit 2% Formaldehyd fixiert und dadurch abgetötet. Eine alternative Behandlung mit Gentamycin hatte zur Folge, dass die Bakterien zwar noch lebten, aber sich durch eine inhibierte Proteinsynthese nicht mehr vermehren konnten.

ERGEBNISSE

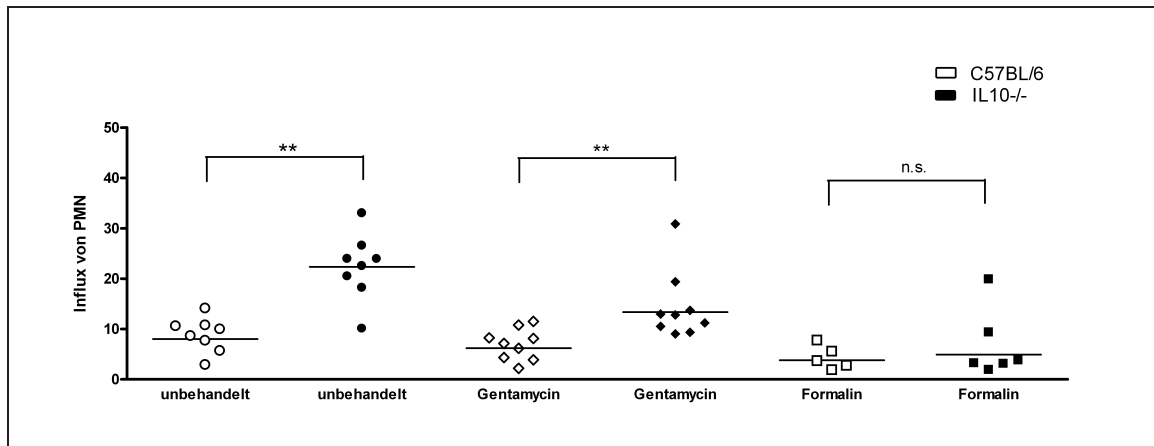


Abbildung 4.8: PMN Influx von IL10^{-/-} und C57BL/6J infiziert mit SL1344 Δ aroA Δ asd: un- behandelt, mit Gentamycin (500 μ g/ml, 2h) oder Formalin (2%, 2h auf Eis) behandelt. FACS- Analyse der PP an d1 p.i.. Im Gegensatz zu den mit Formalin abgetöteten Bakterien, konnten die mit Gentamycin behandelten, eine signifikant erhöhte Immunreaktion auslösen, jedoch nicht vergleich- bar mit dem unbehandelten Stamm. Ergebnisse aus 2 Versuchen. ** P<0,005, n.s.: nicht signifikant. MannWhitney U-Test.

Die mit Gentamycin behandelten Salmonellen waren in der Lage einen IL-10 abhängigen signifikanten Influx von PMN in die PP an d1 p.i. zu bewirken. Im Vergleich zu den unbehan- delten Salmonellen ist dieser jedoch verringert. Die durch Formaldehyd abgetöteten Bakte- rien konnten in IL10^{-/-} keinen erhöhten PMN-Influx auslösen. Aktive Salmonellen sind also möglicherweise notwendig, um eine Entzündungsreaktion auszulösen, die anschließend von IL-10 begrenzt wird.

Unter verschiedenen *Salmonella*- spezifischen Aktivitäten gibt es mehrere Kandidaten:

(A) Im Genom von *Salmonella* gibt es 2 Abschnitte die eine Vielzahl an Genen enthal- ten, welche für die Virulenz wichtig sind und dementsprechend als *Salmonella* Pathoge- nitätsinseln (SPI-1 und SPI-2) bezeichnet werden. Beide Gruppen kodieren für strukturell ähnliche T3SS, welche für die Sekretion von Effektorproteinen in die Wirtszelle essentiell sind. Während die Genprodukte von SPI-1 hauptsächlich für die Invasion in Wirtszellen un- abdingbar sind, werden die Proteine, die von SPI-2 kodiert werden, zum größten Teil für das Überleben in Makrophagen benötigt.

(B) PhoP ist Teil des Zweikomponentenregulationssystems PhoP/Q, welches auf eine Mg²⁺-limitierte Umgebung reagiert und die Expression von mehr als 40 Genen kontrolliert. Diese Gene werden für das Überleben der Salmonellen in den Makrophagen, die Modifika- tion des LPS und die Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden benötigt [152].

(C) Eine mögliche Rolle bei der Aktivierung einer Immunantwort im Darm wurde für Flagellin von *Salmonella* Typhimurium beschrieben [216]. Der $\Delta flhD$ -Mutante fehlt das Hauptregulon für die Expression von Genen, die verantwortlich für den Basalkörper und die Flagellenfilamente des Flagellenapparats sind [217] [99].

Um die Bedeutung dieser Faktoren bei der Initiierung der angeborenen IL-10 abhängigen Immunantwort zu untersuchen, wurden definierte Mutanten von SL1344 $\Delta aroA$ Δasd generiert, denen diese Faktoren fehlen.

4.3.3 Infektion von IL10^{-/-} mit SL1344 $\Delta aroA$ Δasd $\Delta flhD$ (Flagellenmutante)

Flagellenproteine werden vom Toll-like Rezeptor 5 (TLR 5) erkannt und eine pro-inflammatorische Wirkung konnte schon beschrieben werden [216]. Die $\Delta flhD$ Mutation resultiert in dem Verlust des kompletten Flagellenapparats [99].

Eine Infektion von IL10^{-/-} mit dieser Salmonellenmutante sollte zeigen, ob die Flagellenproteine im Fall einer von IL-10 regulierten angeborenen Immunantwort von Bedeutung sind.

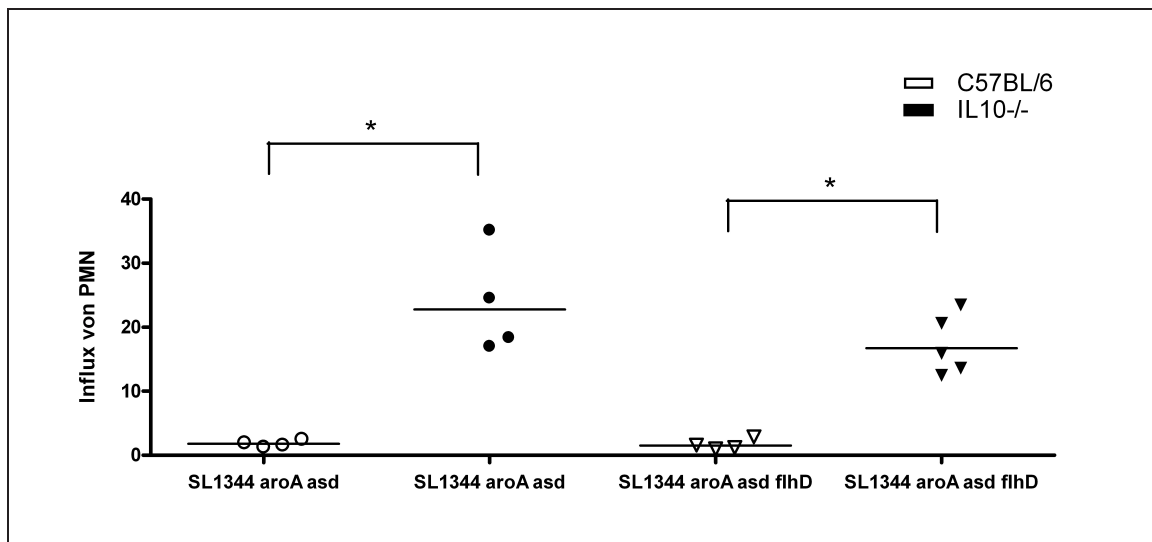


Abbildung 4.9: **PMN Influx von IL10^{-/-} und C57BL/6J nach Infektion mit SL1344 $\Delta aroA$ Δasd $\Delta flhD$.** FACS Analyse der PMN Infiltration von IL10^{-/-} und C57BL/6J in PP 1 Tag nach der Infektion mit 5×10^{10} SL1344 $\Delta aroA$ Δasd als Kontrolle bzw. SL1344 $\Delta aroA$ Δasd $\Delta flhD$. Ergebnis repräsentativ für 2 unabhängige Versuche. * $P < 0,05$, n.s.: nicht signifikant. MannWhitney U-Test.

Eine Infektion von IL10^{-/-} mit der Flagellenmutante zeigte eine mit der *asd*-Mutante ver-

gleichbare erhöhte Infiltration an PMN. Demnach spielen die Flagellen bei der Induktion der Entzündung keine essentielle Rolle.

4.3.4 Infektion von IL10^{-/-} mit SL1344 $\Delta phoP$ $\Delta invG$ $\Delta ssrB$

SL1344 $\Delta phoP$ $\Delta invG$ $\Delta ssrB$ ist eine Salmonellenmutante, der die meisten wichtigen Virulenzfaktoren fehlen. InvG ist Teil des SPI-1 T3SS [123] [97]. Über diesen nadelähnlichen Apparat injizieren die Salmonellen ihre Effektorproteine in die Wirtszelle, welche für die Invasion benötigt werden [103]. Die Invasion in die PP ist aber bei der verwendeten hohen Infektionsdosis von 5×10^{10} KBE nicht beeinträchtigt [210]. SsrB ist ebenfalls Teil eines Zweikomponentenregulationssystems (SsrA/B), liegt jedoch innerhalb von SPI-2 und wird für die Expression der SPI-2 Gene benötigt. Die Induktion der Expression dieser Gene erfolgt in intrazellulärer Umgebung und ist Voraussetzung für die Replikation in Makrophagen, sowie für die systemische Infektion in Mäusen.

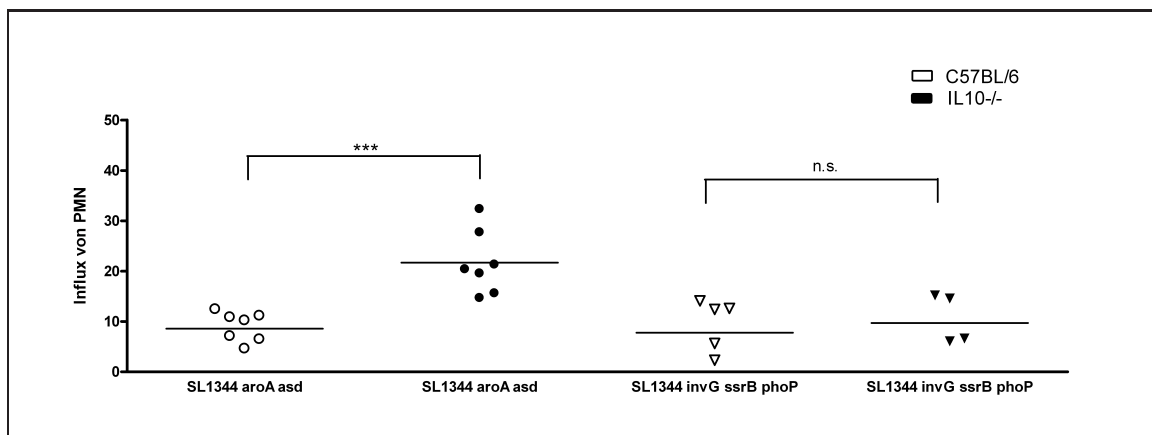


Abbildung 4.10: **PMN Influx in PP von IL10^{-/-} und C57BL/6J nach Infektion mit SL1344 $\Delta phoP$ $\Delta invG$ $\Delta ssrB$.** Infektion von IL10^{-/-} und C57BL/6J mit 5×10^{10} SL1344 $\Delta aroA$ Δasd (Kontrolle) und 5×10^{10} SL1344 $\Delta phoP$ $\Delta invG$ $\Delta ssrB$; PMN Infiltration in PP an d1 p.i. Ergebnis repräsentativ für 3 Versuche. *** $P < 0,001$, n.s.: nicht signifikant. MannWhitney U-Test.

Die Salmonellenmutante, der diese Virulenzfaktoren fehlen, konnte in IL10^{-/-} Tieren im Vergleich zu C57BL/6J keine erhöhte PMN Infiltration auslösen. Da die Mutante aber auch in C57BL/6J eine leichte initiale Entzündungsreaktion zeigte, entsprechend dem Kontrollstamm in C57BL/6J, kann ausgeschlossen werden, dass die Mutante nicht in der Lage war in die PP einzudringen und aus diesem Grund keine verstärkte Immunreaktion auslöste. Um zu untersuchen, welche der fehlenden Virulenzfaktoren für die IL-10 regulierte, angeborene Immunantwort verantwortlich sind, wurden die drei Mutationen der Dreifachmutante

($\Delta phoP$, $\Delta invG$, $\Delta ssrB$) separat in den Salmonellenkontrollstamm SL1344 $\Delta aroA$ Δasd eingebracht.

4.3.5 Infektion von IL10^{-/-} mit SL1344 $\Delta aroA$ Δasd $\Delta phoP$, SL1344 $\Delta aroA$ Δasd $\Delta invG$, SL1344 $\Delta aroA$ Δasd $\Delta ssrB$

Die drei generierten attenuierten Mutanten zeigen unterschiedliche Defekte in für die Virulenz der Salmonellen wichtigen Kontrollgenen. Die PMN Infiltration in den PP als Folge einer oralen Infektion mit diesen Mutanten wurde mittels Durchflusszytometrie einen Tag nach der Infektion bestimmt.

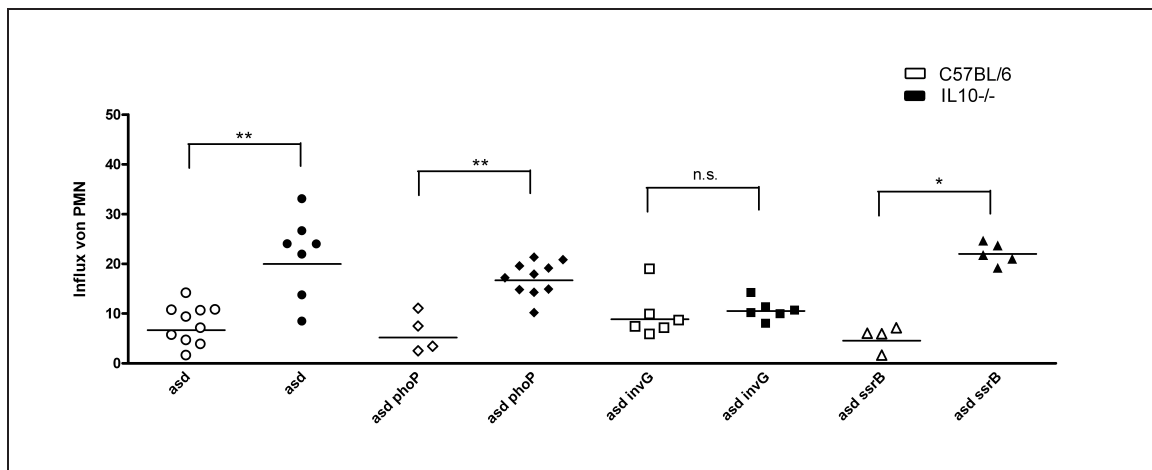


Abbildung 4.11: **PMN Influx von IL10^{-/-} nach oraler Infektion mit 5×10^{10} SL1344 $\Delta aroA$ Δasd , 5×10^{10} SL1344 $\Delta aroA$ Δasd $\Delta phoP$, 5×10^{10} SL1344 $\Delta aroA$ Δasd $\Delta invG$, 5×10^{10} SL1344 $\Delta aroA$ Δasd $\Delta ssrB$.** FACS Analyse der PMN Infiltration in den PP an d1 p.i. zeigte nur bei SL1344 $\Delta aroA$ Δasd $\Delta invG$ keine mit der Kontrolle (SL1344 $\Delta aroA$ Δasd) vergleichbare Entzündungsreaktion. Ergebnisse aus je 2 Versuchen zusammengefasst. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$, n.s.: nicht signifikant. Mann-Whitney U-Test.

SL1344 $\Delta aroA$ Δasd $\Delta phoP$ bewirkte in IL10^{-/-} ebenso eine signifikante Erhöhung in der PMN Infiltration wie der Parentalstamm SL1344 $\Delta aroA$ Δasd . Ähnliches wurde für SL1344 $\Delta aroA$ Δasd $\Delta ssrB$ beobachtet. Demnach spielen die von PhoP kontrollierten Gene und die SPI-2 Effektoren keine Rolle für die IL-10 regulierte Immunantwort. Dagegen konnte die Mutante, der zusätzlich *invG* und somit das SPI-1 T3SS fehlt, keine signifikante PMN Erhöhung in den PP von IL10^{-/-} induzieren. Als Baustein des SPI-1 Sekretionsapparates ist *InvG* essentiell für deren Funktion. Diese Mutante kann keine Effektorproteine mehr über das SPI-1 T3SS sekretieren. Welche der sekretierten Effektorproteine für die Induktion der

Entzündung verantwortlich sind, sollte durch weitere Salmonellenmutanten geklärt werden, denen bestimmte dieser Effektoren fehlen.

4.3.6 Infektion von IL10^{-/-} mit SL1344 $\Delta aroA$ Δasd $\Delta sipB$

Im vorhergehenden Experiment konnten die SPI-1 Effektorproteine als essentielle Faktoren zur Induktion der frühen IL-10 abhängigen Immunantwort identifiziert werden. Über den SPI-1 Sekretionsapparat werden 13 Proteine sekretiert [52], welche für die Invasion über die Epithelzellen des Wirtes von Bedeutung sind oder direkt zur Rekrutierung von PMN bzw. entzündungsvermittelten Zellen führt. Auch wenn die Salmonellen im murinen Infektionsmodell hauptsächlich über die M-Zellen in die PP gelangen, spielen diese Proteine offenbar trotzdem noch eine wichtige Rolle bei der Entzündungsreaktion. SipB ist ein interessanter Kandidat hierfür. Es ist ein Homolog zu IpaB von *Shigella* und beide werden sowohl für die Internalisierung in die Wirtszellen als auch für das Auslösen der Apoptose in Makrophagen benötigt. Dabei wird Caspase-1 aktiviert, welche für die Sezernierung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 zuständig ist. SipB ist außerdem für die Translokation der anderen Effektoren von *Salmonella* essentiell [99].

Es wurde hier eine Mutante SL1344 $\Delta aroA$ Δasd $\Delta sipB$ generiert und anschließend IL-10 defizienten Mäusen oral appliziert.

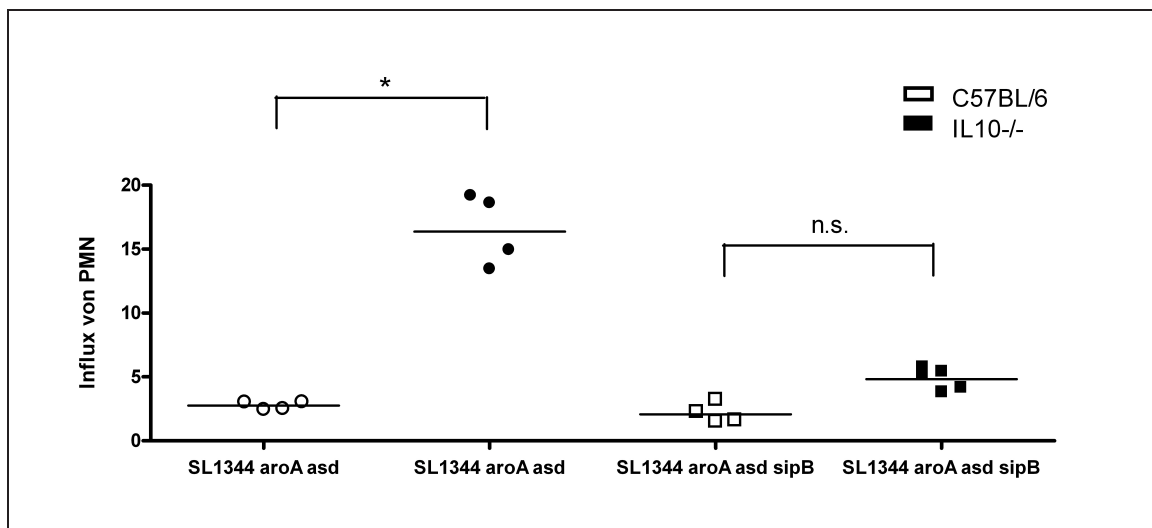


Abbildung 4.12: PMN Influx von IL10^{-/-} Mäusen nach Infektion mit 5×10^{10} SL1344 $\Delta aroA$ Δasd (Kontrolle), 5×10^{10} SL1344 $\Delta aroA$ Δasd $\Delta sipB$. Die durchflusszytometrische Analyse der PP an d1 p.i. zeigte keinen erhöhten Influx von PMN nach Infektion mit SL1344 $\Delta aroA$ Δasd $\Delta sipB$. Ergebnis repräsentativ für 2 unabhängige Versuche. * P<0,05, n.s.: nicht signifikant. MannWhitney U-Test.

Die Infektion mit der $\Delta sipB$ Mutante zeigte, dass durch den Verlust dieses Effektors keine erhöhte Immunreaktion in IL10^{-/-} mehr ausgelöst werden konnte und SipB demnach von entscheidender Bedeutung während dieses Prozesses der frühen Immunantwort sein muss.

Diese Ergebnisse zeigen, dass SPI-1 Virulenzgene die IL-10 regulierte Entzündungsreaktion stark beeinflussen. Das hier etablierte Infektionssystem ermöglichte es damit bakterielle Faktoren zu finden die für die Ausbildung einer Entzündungsreaktion von entscheidender Bedeutung sind. Ferner erlaubt die Infektion mit SL1344 $\Delta aroA \Delta asd$ wichtige Faktoren auf der Seite des Wirts zu analysieren, sowie die Zelltypen die bei dem Prozess entscheidend sind. In den folgenden Abschnitten wurden zelltypspezifische *knock-out* Mäusen und die IL-10 Deletion im C3H/HeJ genetischen Hintergrund untersucht.

4.4 IL-10 im C3H/HeJ genetischen Hintergrund

Die IL-10 Mutation hat im C3H/HeJ genetischen Hintergrund einen stärker ausgeprägten IBD Phänotyp als im C57BL/6J Hintergrund. Diese unterschiedliche Empfindlichkeit ließ sich auf 10 QTLs zurückführen (QTL=quantitative trait locus) [41]. Der C3H/HeJ Stamm, der für diese Experimente verwendet wurde, trägt eine zusätzliche Mutation im Gen für den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4). Dadurch ist dieser Stamm nicht mehr dazu in der Lage LPS und somit Gram-negative Bakterien zu erkennen. Dieser Versuch wurde unter SPF-Bedingungen im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule in Hannover durchgeführt. Als Kontrollen dienten IL10^{-/-} Mutanten im C57BL/6J Hintergrund, die unter denselben Bedingungen gehalten wurden.

ERGEBNISSE

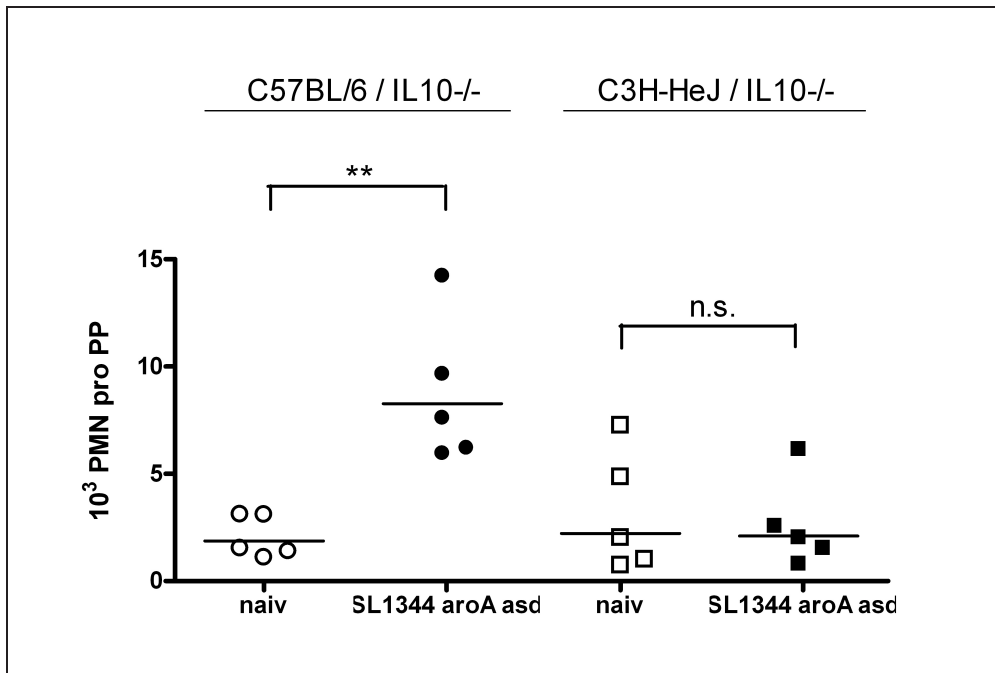


Abbildung 4.13: Zahl an PMN pro PP in IL10^{-/-} Mutanten im C57BL/6J und C3H/HeJ genetischen Hintergrund nach Infektion mit SL1344 Δ aroA Δ asd. C57BL/6J-IL10^{-/-} und C3H/HeJ-IL10^{-/-} Tiere wurden oral mit 5×10^{10} SL1344 Δ aroA Δ asd infiziert. Als Kontrollen dienten uninfizierte Tiere. Durch die TLR4-Mutation im C3H/HeJ Hintergrund konnte der Salmollenstamm keine Erhöhung im PMN Influx hervorrufen. ** $P < 0,005$, n.s.: nicht signifikant. MannWhitney U-Test.

Während SL1344 Δ aroA Δ asd in C57BL/6J IL10^{-/-} auch unter diesen SPF-Bedingungen eine Entzündungsreaktion auslösen konnte, zeigten die C3H/HeJ-IL10^{-/-} keine vergleichbare Immunreaktion. Das Fehlen des TLR4 und somit das Nichterkennen Gram-negativer Bakterien ist vermutlich dafür verantwortlich, was darauf hinweist dass dieser Entzündungsweg über TLR4 initiiert wird. Das unterstützt die von Yvonne Willer erzielten Ergebnisse, das TLR4 essentiell für die frühe Entzündungsreaktion gegen Salmonellen ist [210] und es unterstützt die Ergebnisse von Kolitis-Versuchen, die ebenfalls zeigten, dass diese TLR4 abhängig ist. In diesem Fall könnten aber ebenso die genetischen Unterschiede zwischen C57BL/6J und C3H/HeJ eine Ursache dafür sein. Um die Rolle von TLR4 in diesem Prozess zu untersuchen, wäre eine IL-10 defiziente Maus mit zusätzlicher Mutation im Gen für TLR4 nötig.

4.5 Das IL-10 Netzwerk

IL-10 wird von einer Vielzahl an Zelltypen produziert, darunter Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen, Mastzellen, DCs und Enterozyten. Roers et al. konnten bereits zeigen, dass T-Zellen der Hauptproduzent von IL-10 sind, der die Induktion einer chronischen Entzündung des Kolons verhindert [170]. Der Rezeptor für IL-10 wird ebenso auf den meisten hämatopoetischen Zellen exprimiert, wie Makrophagen, Mastzellen, DCs, T-Zellen und B-Zellen. Mit Hilfe des *Cre-loxP*-Systems konnten zelltypspezifische Mutanten von IL-10 und dem IL-10 Rezeptor erzeugt werden, die es ermöglichen einzelne Zelltypen und ihre Rolle in diesem Prozess zu untersuchen. Die folgende Tabelle enthält eine Übersicht über die verwendeten zelltypspezifischen Mausmutanten (detaillierter beschrieben unter Material).

| Abkürzung der Mauslinien | spezifisch für |
|---------------------------------|--------------------------|
| CD4- <i>Cre</i> | T-Zellen |
| CD19- <i>Cre</i> | B-Zellen |
| LysM- <i>Cre</i> | Makrophagen, Neutrophile |

Als Kontrolltiere wurden hierfür *Cre*-negative Geschwistertiere verwendet.

4.5.1 Zelltypspezifische IL10^{-/-}: Wer ist der wichtigste IL-10 Produzent während der frühen Immunantwort?

Als erstes sollte der Hauptproduzent von IL-10 während der frühen Immunantwort auf Salmonellen identifiziert werden. Für diese Versuche standen T-Zellspezifische und Makrophagenspezifische IL-10 *knock-out*-Mausmutanten zur Verfügung. Jene Mäuse wurden mit SL1344 Δ *aroA* Δ *asd* infiziert und an d1 p.i. auf eine Entzündungsreaktion hin untersucht.

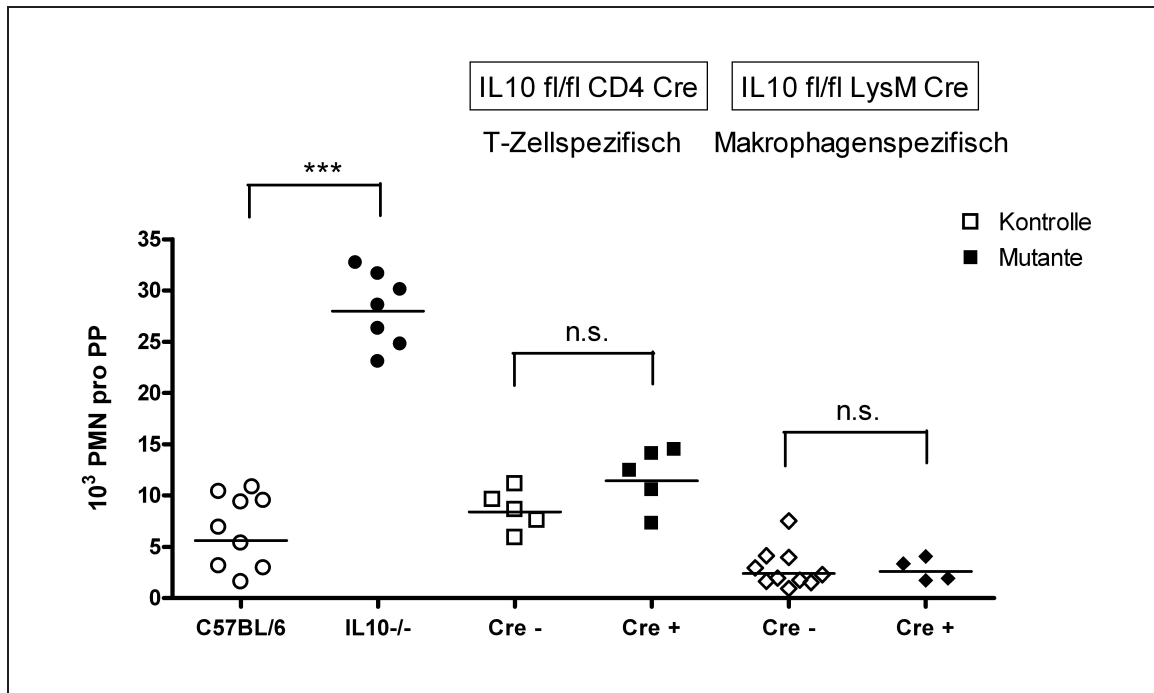


Abbildung 4.14: Zahl an PMN pro PP in T-Zellspezifischen und Makrophagenspezifischen IL10^{-/-} nach Infektion mit SL1344 Δ aroA Δ asd. T-Zellspezifische und Makrophagenspezifische IL10^{-/-} wurden oral mit 5×10^{10} SL1344 Δ aroA Δ asd infiziert. Als Kontrollen dienten Cre-negative Geschwistertiere. IL10^{-/-} und C57BL/6J galten als Kontrollen für die Infektion. Keine der beiden zelltypspezifischen Mutanten zeigte eine Erhöhung im PMN Influx. Das Ergebnis ist repräsentativ für 3 Versuche. *** P<0,001, n.s.: nicht signifikant. MannWhitney U-Test.

In den beiden zelltypspezifischen IL-10 *knock-outs* führte eine Infektion mit SL1344 Δ aroA Δ asd nicht zu einer Entzündungsreaktion, wie sie in den IL10^{-/-} Tieren beobachtet werden konnte. In der angeborenen Immunreaktion sind weder T-Zellen noch Makrophagen und Neutrophile die alleinigen Hauptproduzenten des zur Kontrolle der Entzündung benötigten IL-10.

4.5.2 Zelltypspezifische IL10R^{-/-}: Wer ist der wichtigste Rezipient des IL-10 Signals während der frühen Immunantwort?

Im nächsten Abschnitt sollten zelltypspezifische *knock-outs* des IL-10 Rezeptors analysiert werden, um relevante Zelltypen für die Aufnahme und Weiterleitung des IL-10 Signals zu identifizieren. Zuvor musste jedoch der Phänotyp des IL-10 Rezeptor-Komplett-*knock-outs* überprüft werden.

ERGEBNISSE

Die Tiere wurden mit dem Kontrollsalmonellenstamm (SL1344 $\Delta aroA$ Δasd) oral infiziert und die Immunantwort in den PP an d1 p.i. analysiert.

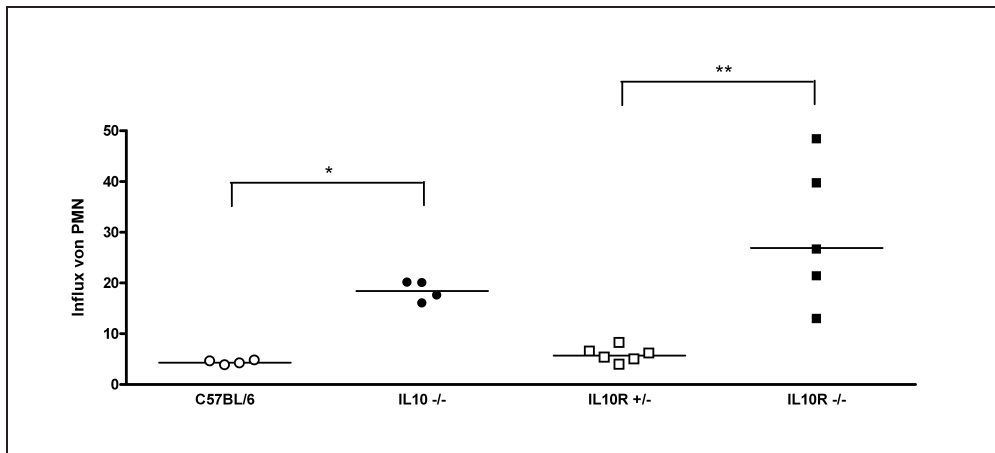


Abbildung 4.15: **Vergleich der PMN Infiltration von IL10^{-/-} und IL10R^{-/-} nach Infektion mit SL1344 $\Delta aroA$ Δasd .** Der PMN Influx in den PP an Tag 1 nach Infektion mit 5×10^{10} SL1344 $\Delta aroA$ Δasd war in den IL10R^{-/-} vergleichbar mit dem in den IL10^{-/-}. Als Kontrollen dienten IL10R^{+/-} und C57BL/6J. Das Ergebnis ist repräsentativ für 2 Versuche. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$. MannWhitney U-Test.

Mit SL1344 $\Delta aroA$ Δasd infizierte IL-10 Rezeptor defiziente Mäuse induzierten ebenso eine signifikante Erhöhung der PMN Zahl in den PP an d1 p.i., wie bei IL10^{-/-}. Ob IL-10 fehlt oder durch Verlust des IL-10 Rezeptors nicht mehr erkannt werden kann, hat also vergleichbare Auswirkungen auf die Immunantwort gegen *Salmonella* Typhimurium.

Durch gezieltes Ausschalten des IL-10 Rezeptors in einzelnen Zelltypen konnten nun relevante Empfänger des IL-10 Signals während der frühen Immunantwort auf *Salmonella* Typhimurium identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden B-Zellspezifische, T-Zellspezifische und Makrophagenspezifische IL-10 Rezeptor *knock-out*-Mäuse oral infiziert und die PMN-Infiltration an d1 p.i. analysiert.

ERGEBNISSE

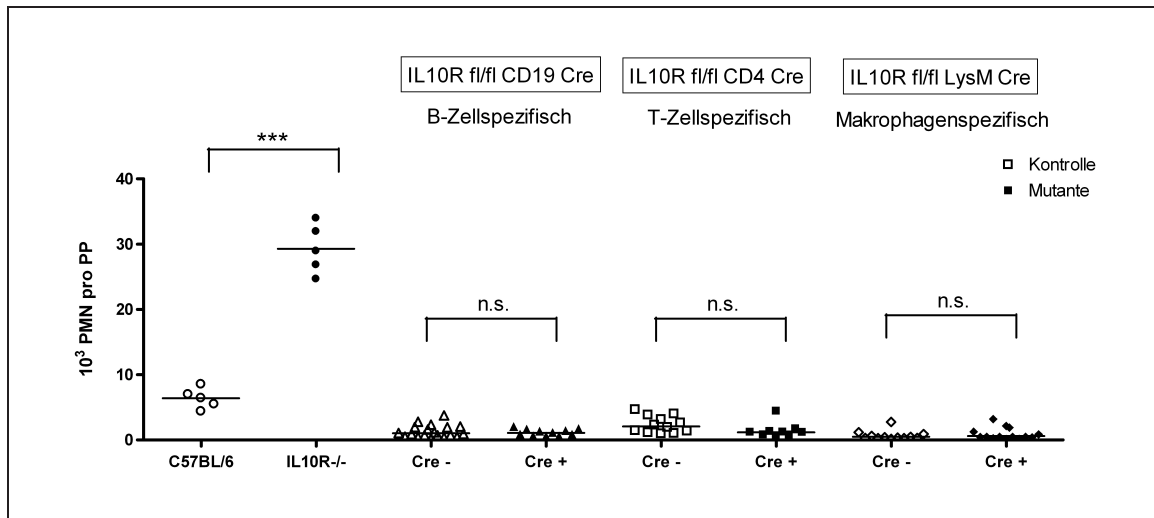


Abbildung 4.16: **Zahl an PMN in B-Zellspezifischen, T-Zellspezifischen und Makrophagenspezifischen IL10R^{-/-} Mäusen nach Infektion mit SL1344 Δ aroA Δ asd.** Durchflusszytometrische Analyse der PP an d1 p.i. nach oraler Infektion mit 5×10^{10} SL1344 Δ aroA Δ asd. Als Kontrollen dienten Cre-negative Geschwistertiere. Keine der drei zelltypspezifischen Mutanten zeigte eine Erhöhung der PMN Infiltration. Die Ergebnisse wurden aus 3 Versuchen zusammengefasst. *** $P < 0,001$, n.s.: nicht signifikant. MannWhitney U-Test.

Eine Infektion mit SL1344 Δ aroA Δ asd führte in keinem der 3 zelltypspezifischen *knock-outs* zu einer signifikanten Erhöhung in der Zahl der PMN in den PP des Dünndarms. Demnach ist keiner der 3 Zelltypen in diesem Modell alleine essentiell für das Empfangen des IL-10 Signals und dessen Weiterleitung.

Die Rolle von DCs und Enterozyten konnte nicht geklärt werden, da diese konditionalen Mutanten nicht zur Verfügung standen. Es ist nicht auszuschließen, dass sie eine entscheidende Rolle bei der Produktion und Weiterleitung des IL-10 Signals spielen. Um die Rolle von DCs zu überprüfen, würde sich ein spezifischer IL-10 sowie IL-10R *knock-out* eignen. Des Weiteren könnten auch *in vitro* Stimulationsversuche mit DCs aus dem Knochenmark von IL10^{-/-} und IL10R^{-/-} aufschlussreich sein. Ein IL-10 *knock-out* in allen hämatopoetischen Zellen könnte die Rolle der Enterozyten klären.

4.5.3 Analyse von IL4-/-IL10^{fl/fl}CD4-Cre und IL12-/-IL10^{fl/fl}CD4-Cre: Rolle von T-Zell-produziertem IL-10 bei einer Th1 oder Th2 dominierten Immunantwort.

Für die adaptive Immunantwort ist allein von T-Zellen produziertes IL-10 ausschlaggebend, um eine Kolitis zu verhindern. Der T-Zellspezifische IL-10 *knock-out* zeigte in diesem Modell der frühen Immunantwort jedoch nur eine leichte Erhöhung gegenüber den Cre-negativen Geschwistertieren, die nicht mit IL10-/- vergleichbar war. Es stellte sich nun die Frage, ob sich bei einem gestörten Gleichgewicht der Th1-Th2-Immunantwort, das T-Zellspezifische Fehlen von IL-10 negativ auf die Entzündungsreaktion auswirkt. Dazu wurde zum einen IL-12 und zum anderen IL-4 deletiert. Der Verlust von IL-12 führt zu einer Th2 dominierten Immunantwort. Das Fehlen von IL-4 dagegen verstärkt Th1.

Die Doppelmutanten wurden mit SL1344 Δ aroA Δ asd infiziert und an d1 p.i. auf eine Entzündungsreaktion hin untersucht.

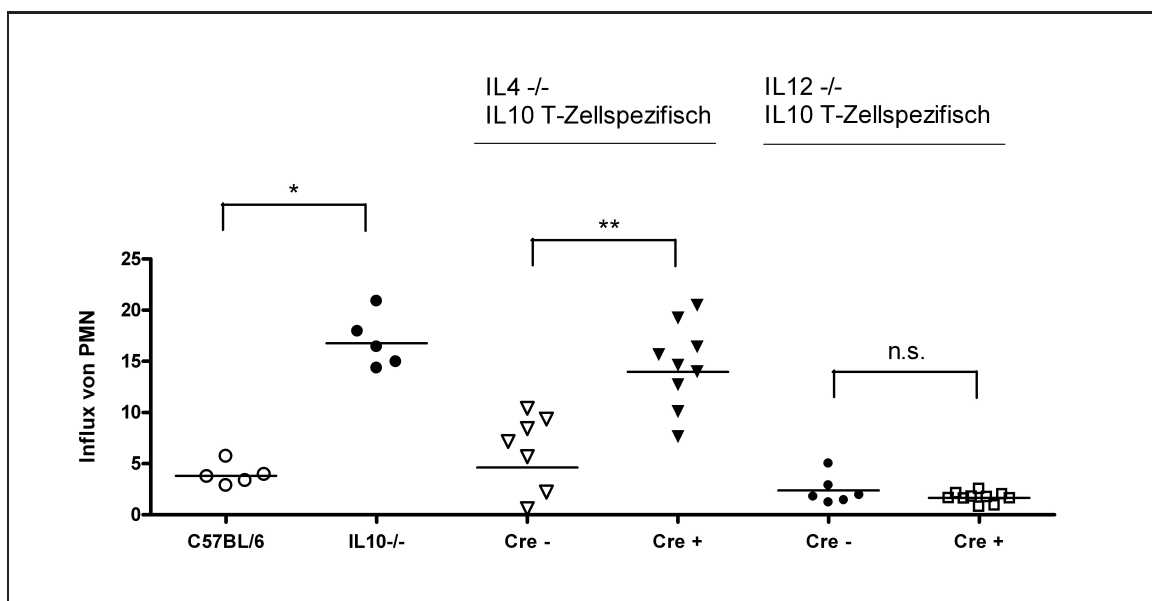


Abbildung 4.17: Zahl an PMN in C57BL/6J, IL10^{-/-}, IL4^{-/-}IL10^{fl/fl}CD4-Cre und IL12^{-/-}IL10^{fl/fl}CD4-Cre nach Infektion mit SL1344 Δ aroA Δ asd. Durchflusszytometrische Analyse der PP an d1 p.i. nach oraler Infektion mit 5×10^{10} SL1344 Δ aroA Δ asd. Als Kontrollen dienten Cre-negative Geschwistertiere. Der zusätzliche Verlust von IL-4, aber nicht IL-12, ruft im T-Zellspezifischen IL-10 *knock-out* (IL10^{fl/fl}CD4-Cre) eine Entzündungsreaktion hervor. Ergebnisse repräsentativ für 2 unabhängige Versuche. * P<0,05, ** P<0,005, n.s.: nicht signifikant. MannWhitney U-Test.

Nach oraler Infektion mit SL1344 Δ aroA Δ asd war der Verlust von IL-10 allein in T-Zellen

ausschlaggebend für eine vermehrte PMN Rekrutierung in IL4^{-/-}, aber nicht in IL12^{-/-}. Bei einer durch den Verlust von IL-4 in die Th1-Richtung polarisierten Immunreaktion, kann nur das von T-Zellen produzierte IL-10 diese kontrollieren.

4.6 Rolle von IL-10 bei einer wiederholten Infektion mit SL1344 $\Delta aroA \Delta asd$

In diesem Versuch wurden IL10^{-/-} Tiere über 3 Wochen, 1 Mal pro Woche mit dem attenuierten Salmonellenstamm SL1344 $\Delta aroA \Delta asd$ infiziert und einen Tag nach der letzten Infektion getötet, um die Entwicklung einer Immunreaktion zu überprüfen. Eine mehrmalige Infektion sollte in Wildtypmäusen zu einer verminderten PMN-Infiltration an d1 p.i. nach der letzten Infektion führen, verglichen mit einmal infizierten Kontrollen. Die erste Infektion diente dazu eine Toleranz zu induzieren, die bei erneutem Kontakt zu einer schnelleren und limitierten Immunreaktion führt. Um die Rolle von IL-10 bei der Ausprägung von regulatorischen T-Zellen zu untersuchen, wurden IL10^{-/-} eingesetzt.

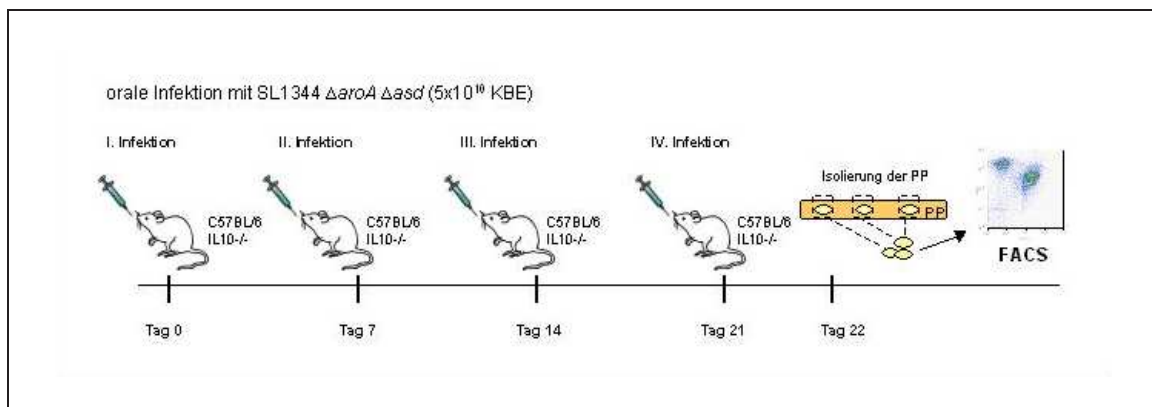


Abbildung 4.18: **Versuchsaufbau der viermaligen Infektion.** Über einen Verlauf von 3 Wochen wurden IL10^{-/-} und C57BL/6J Kontrolltieren viermal infiziert, 1 Mal pro Woche. Einen Tag nach der letzten Infektion wurden die Mäuse getötet, die PP isoliert und im FACS analysiert.

ERGEBNISSE

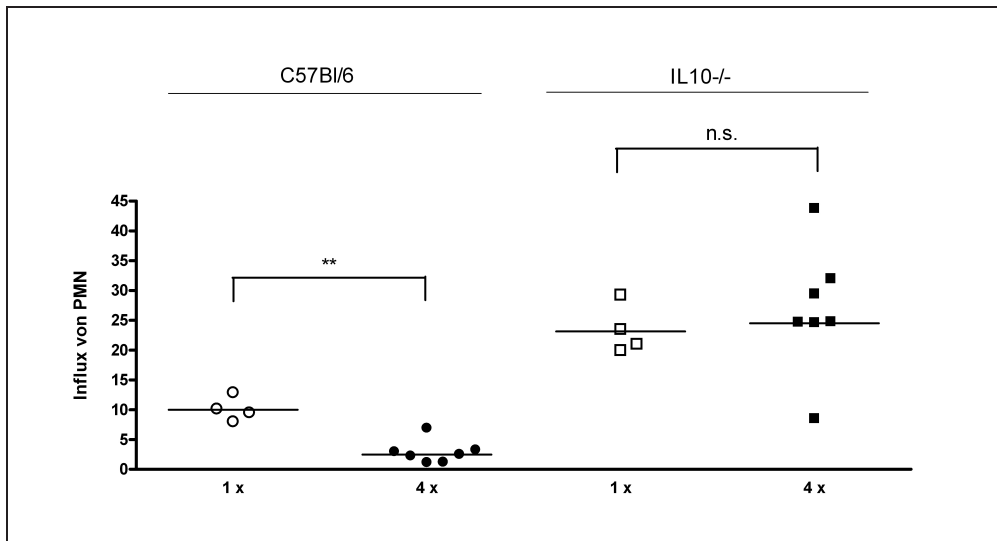


Abbildung 4.19: **PMN Influx in PP von IL10^{-/-} und C57BL/6J Mäuse nach viermaliger Infektion.** Einen Tag nach der letzten Infektion mit 5×10^{10} SL1344 Δ aroA Δ asd wurden die PP isoliert und im FACS analysiert. Im Vergleich mit einer einmaligen Infektion zeigten die C57BL/6J Mäuse nach 4 Infektionen eine signifikante Verringerung in der PMN Infiltration. Die Zahl der PMN zeigte keinen Unterschied in den IL10^{-/-} nach einmaliger oder viermaliger Infektion. ** $P < 0,005$, n.s.: nicht signifikant. MannWhitney U-Test.

Die C57BL/6J Wildtypmäuse zeigten nach wiederholter Infektion eine Reduzierung in der Immunreaktion, gegenüber einer einmaligen Infektion. Die Immunantwort bei IL10^{-/-} blieb jedoch unverändert. Diese Versuche bestätigen, dass IL-10 für die Ausbildung der oralen Toleranz notwendig ist.

5. Diskussion

Das Ziel des ersten Teiles dieser Arbeit war es, anhand eines Pathogens ein Infektionsmodell zu entwickeln, um die Rolle des immunsuppressiven Zytokins IL-10 während der frühen angeborenen Immunantwort gegen Darmbakterien zu untersuchen. Unter Verwendung verschieden stark attenuierter Mutanten (Virulenzdefekte) von *Salmonella* Typhimurium sollten für diesen Vorgang essentielle Faktoren auf der Seite des Pathogens überprüft werden. Zelltyp-spezifische IL-10 *knock-outs* ermöglichten es, die Rolle verschiedener Wirtszellen bei der frühen Immunantwort gegen Salmonellen zu untersuchen.

Das von einer Vielzahl von Immunzellen wie z.B. T-Zellen, B-Zellen, DCs, Mastzellen, Makrophagen und Enterozyten produzierte Interleukin IL-10 wirkt unter Inhibierung der Makrophagenaktivierung und Antigenpräsentation entzündungshemmend. Mäuse mit defektem IL-10 (IL10^{-/-}) weisen eine gestörte Darmhomöostase auf und entwickeln ausgelöst durch die residente Darmflora spontane Kolitis. IL10^{-/-} Mäuse, die keimfrei gehalten werden und interessanterweise auch die in der Tierhaltung des Helmholtz Zentrums (HZI) gehaltenen IL10^{-/-} entwickeln dagegen keine spontane Kolitis [61]. Die HZI-Tiere sind mit einer begrenzten Anzahl definierter Bakterienspezies assoziiert. Zu dieser sogenannten Schaedler-Flora (CRASF®= Charles River Altered Schaedler Flora) gehört unter anderem *Lactobacillus acidophilus*. Jene Spezies hat nachweislich eine probiotische Wirkung und kann unter Umständen Schutz vor einer chronischen Infektion bieten [209]. Wichtig zu erwähnen ist, dass in dieser Darmflora kein *E. coli* enthalten ist, wie üblicherweise unter SPF-Bedingungen. Bei diesen am HZI gehaltenen Tieren konnte eine Kolitis gezielt nach Behandlung mit DSS (Dextran Sulfat Sodium) induziert werden [61].

5.1 Entwicklung eines Infektionsmodells

Während sich in Mensch und Rind die Infektion mit *Salmonella* Typhimurium in einer lokalen Enterokolitis manifestiert, die sich in der Regel nicht systemisch ausbreitet, entwickeln Mäuse diese Form der Enterokolitis nicht. Dort kommt es zu einer systemischen Ausbreitung die typhoidalem Fieber ähnelt. Dagegen ist in Wildtypmäusen die orale Infektion mit

einer metabolisch attenuierten Form von *S. Typhimurium* ($\Delta aroA$) grostenteils lokal auf den Darm begrenzt [70] und ermöglicht dadurch die Untersuchung einer Entzündungsreaktion im Darm (Salmonellosis). Dieser Stamm hat durch den Verlust des *aroA*-Gens einen Defekt in der Chorismat-Biosynthese, dem Syntheseweg für aromatische Aminosäuren und Chinone [60] [189]. Die Folge ist ein transienter selbstlimitierender Infektionsverlauf. Der zusätzliche Verlust des *asd*-Gens, dessen Produkt an der Bildung der Zellwand beteiligt ist, führt zur Lyse der Zellen während des Teilungsprozesses. Durch Zugabe von Diaminopimelinsure (DAP) kann der *asd*-Funktionsverlust *in vitro* ausgeglichen werden. *In vivo* steht den Bakterien jedoch kein DAP mehr zur Verfügung, was zum schnellen Absterben führt. Eine orale Infektion mit einer sehr hohen Infektionsdosis dieser Salmonellenmutante weist eine im Vergleich mit uninfizierten Tieren signifikante initiale Entzündungsreaktion 3 Stunden nach der Infektion auf. Diese ist gekennzeichnet durch eine Erhöhung der Neutrophilen (PMN)-Infiltration in den PP. Durch den schnellen Tod der Bakterien geht das Signal früh verloren und die Entzündung wird rasch wieder aufgelöst. Diese Mutante, SL1344 $\Delta aroA \Delta asd$, ist optimal für die Analyse der frühen Immunantwort, da sie *in vivo* nicht replizieren kann und die Entzündungsreaktion somit direkt auf den initialen Kontakt zurückzuführen ist und nicht durch komplexe Gewebeerstörung überlagert wird.

Die IL-10 defizienten Tiere zeigten 3h nach der Infektion eine mit Wildtypmäusen (C57BL/6J) vergleichbare Entzündungsreaktion. Mittels Immunhistochemie konnten diese PMN im subepithelialen Domareal der PP in der näheren Umgebung der Salmonellen lokalisiert werden. Nach dem Absterben der Salmonellen begann die Entzündungsreaktion in den Wildtypmäusen abzuklingen. Ohne IL-10 wurden jedoch weitere PMN rekrutiert, die interessanterweise in den interfollikularen Regionen (IFR) der PP akkumulierten. Im Normalfall kommt es zur Rekrutierung von Neutrophilen über die HEV (*high endothelial venules*) in die interfollikularen Regionen der PP als Antwort auf eine deutlich zunehmende bakterielle Vermehrung [16]. Infolge der genetischen Defekte ist die verwendete Salmonellenmutante jedoch nicht lebensfähig. Möglicherweise wandern aktivierte DCs vom Dom in die IFR und lösen dort die PMN Infiltration aus [184].

Die Ergebnisse manifestieren eine Rolle von IL-10 in der Begrenzung der frühen Entzündungsreaktion gegen ungefährliche schnell absterbende Darmbakterien. Die in Wildtypmäusen rasch aufgelöste Immunantwort verhindert Schädigungen am Gewebe [143]. Denn die aktivierten Makrophagen produzieren IL-1 α , IL-18 und Chemokine. Diese locken erneut Neutrophile und Makrophagen an [76], welche nach Aktivierung mehr pro-inflammatorische Zytokine produzieren. Auf diese Weise kommt es zu einer Anhäufung von inflammatorischen Zellen. Das Zytokin IL-10 begrenzt diese Kettenreaktion.

Nach dem Eindringen der Salmonellen über die M-Zellen des Follikel-assoziierten Epithels in die PP werden sie von Antigenpräsentierenden Zellen, wie Makrophagen und DCs,

aufgenommen. Wie Yvonne Willer in ihrer Dissertation zeigen konnte, ist für eine frühe Entzündungsreaktion nicht das Durchbrechen der Epithelbarriere als solches ausschlaggebend, sondern die Höhe der bakteriellen Last erreicht durch eine hohen Infektionsdosis avirulenter oder kommensaler Stämme. Auch Kommensale lösen diese initiale Entzündungsreaktion aus. Bei einer hohen Infektionsdosis konnten auch abgetötete Salmonellen und inerte Latexpartikel in den PP detektiert werden [184]. Durch die an Tag 1 nach der Infektion um ein Vielfaches erhöhte Immunreaktion in den IL-10 defizienten Mäusen stellt dies einen hervorragenden Hintergrund zur Untersuchung der Relevanz bestimmter bakterieller und wirtseigener Faktoren in diesem Prozess der frühen Immunantwort dar. Denn auch attenuierte Mutanten von *S. Typhimurium* mit Defekten in für die Invasion in Epithelzellen benötigten Virulenzgenen, können auf ihr Virulenzpotential hin überprüft werden. Spezielle sekretierte Chemokine bewirken die selektive Anziehung von Leukozyten, wie PMN, sowie von Makrophagen, welche dann für die Vernichtung des infektionsauslösenden Erregers verantwortlich sind. Als Nachweis für eine eingeleitete Immunreaktion wurde durchflusszytometrisch die Zahl an eingewanderten Neutrophilen bestimmt.

5.2 EcN induziert in IL10-/- eine weniger starke Immunantwort als *Salmonella*

Salmonella ist sehr nah verwandt mit einem typischen Vertreter der residenten Darmflora, dem größtenteils als Kommensalen vorkommenden Bakterium *E. coli*. Die wichtigsten Unterscheidungsmerkmale sind die Virulenzfaktoren von *S. Typhimurium* sowie eine etwas andere Oberflächenstruktur, (insbesondere LPS) betreffend. Die in dieser Arbeit eingesetzte hohe Infektionsdosis ermöglichte *E. coli*-Stamm EcN (*E. coli* Nissle 1917) die Internalisierung in die PP. Der verwendete EcN wird auch als Probiotikum eingesetzt. Entgegen der allgemeinen Meinung, dass Probiotika eine Toleranz über die Induktion anti-inflammatorischer Signalwege auslösen, verursachte die Infektion mit diesem Stamm in den Wildtypmäusen eine mit der Δasd -Mutante von *Salmonella* vergleichbare, initiale Entzündungsreaktion. Allerdings kam es bei EcN anders als bei Salmonellen zu keiner erhöhten Reaktion in IL-10 defizienten Tieren. Offenbar besitzen Salmonellen gegenüber EcN spezifische Faktoren deren pro-inflammatorische Wirkung nur von IL-10 unterdrückt werden kann. Das EcN in der Lage ist eine leichte Entzündungsreaktion in den Wildtypmäusen auszulösen, lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass die hier vorhandene CRASF®-Flora der Versuchstiere keinen *E. coli* enthält und somit noch keine Toleranz gegen diesen Stamm etabliert werden konnte.

Wie das Pathogen *Salmonella* verfügt *E. coli* über Oberflächenmoleküle, wie LPS und Fla-

gellen, die von speziellen Toll-like Rezeptoren (TLR4 und TLR5) erkannt werden und auf diese Weise die Entzündungsreaktion auslösen. Trotzdem ist der hier verwendete Stamm EcN nicht in der Lage in den IL-10 defizienten Tieren eine vergleichbare erhöhte PMN-Infiltration an Tag 1 nach der Infektion auszulösen. Unterschiede in der Beschaffenheit des LPS könnten der Auslöser für eine Immunantwort gegen das eine aber nicht gegen das andere Bakterium sein.

5.3 Lebensfähige Salmonellen sind notwendig, um eine verstärkte Entzündungsreaktion in IL10-/- auszulösen

Im Folgenden wurde untersucht, welche dieser Komponenten für die IL-10 regulierte Immunantwort verantwortlich ist. Die orale Infektion mit abgetöteten Salmonellen (Formalinfixiert) konnte keine erhöhte PMN-Infiltration in IL10-/- auslösen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Oberflächenmoleküle der Salmonellen Auslöser für die verstärkte Entzündungsreaktion sind, da Formalin die Bakterien nicht nur abtötet, sondern als Nebeneffekt auch deren Antigene kovalent modifiziert [50]. Werden die Salmonellen dagegen vor der Applikation mit Gentamycin behandelt, zeigen sie eine im Vergleich zu dem unbehandelten Stamm verminderte Influxrate an Neutrophilen. Konfrontiert mit der Entzündungsreaktion in Wildtypmäusen ist sie jedoch signifikant erhöht. Als Aminoglykosidantibiotikum wirkt sich Gentamycin irreversibel auf die Proteinsynthese aus. Damit behandelte Bakterien sind zwar noch lebensfähig, aber durch die gehemmte Translation können keine neuen Proteine mehr hergestellt werden. Die Aktivität der T3SS sollte durch das Antibiotikum vermutlich nicht beeinträchtigt sein. Die beiden Resultate deuten an, dass lebensfähige Salmonellen notwendig sind, um die von IL-10 regulierte Entzündungsreaktion auszulösen.

Die Mehrheit der von *S. Typhimurium* *in vitro* sekretierten Proteine sind Flagellenproteine und die über die T3SS exportierten Virulenzfaktoren [99]. Das inflammatorische Potential beider Gruppen an Proteinen konnte sowohl in *in vitro* Studien, als auch in *in vivo* Modellen nachgewiesen werden [86] [190]. Um deren Effektivität bei der IL-10 regulierten angeborenen Immunantwort zu untersuchen, wurden spezifische Mutanten des Δasd -Stamms im IL-10 basierten Infektionsmodell eingesetzt. Die orale Infektion mit einem Stamm dem das Hauptregulon für die Expression aller Flagellengene fehlt (FlhD), induzierte in IL10-/- eine quantitativ gleichwertige PMN Infiltration, wie der Parentalstamm. Die Flagellen stellen zwar einen potenten Induktor einer frühen Entzündungsreaktion dar, jedoch ist das Zytokin IL-10 in diesem Prozess nicht von Bedeutung.

5.4 Eingrenzung der entzündungsauslösenden Faktoren auf SPI-1 Effektoren

Mit einer Dreifachmutante ($\Delta invG$, $\Delta ssrB$ und $\Delta phoP$) von *S. Typhimurium*, der praktisch alle wichtigen Virulenzfaktoren fehlen, sollte deren Einfluss analysiert werden. Im Genom von *Salmonella* gibt es 5 Kluster (SPI = *Salmonella* Pathogenitätsinseln) an Genen mit bestimmten Funktionen für die Virulenz. Die beiden wichtigsten, SPI-1 (*invG*) und SPI-2 (*ssrB*), kodieren für T3SS und die darüber sekretierten Effektoren, welche für das Durchbrechen der epithelialen Barriere (SPI-1) und das intrazelluläre Überleben der Salmonellen (SPI-2) notwendig sind. Die Expression dieser Gene wird zu unterschiedlichen Zeitpunkten induziert. PhoP als Teil eines Zweikomponentenregulationssystems kontrolliert die Expression einer Vielzahl weiterer Gene, deren Aufgaben neben Schutz vor antimikrobiellen Faktoren [66], auch in der LPS- und OMPs- (Outer Membrane Proteins) Modulation liegen, eine Funktion, die für die Salmonellenpathogenese essentiell ist. Seine Aktivität wird über das Mg^{2+} -sensitive PhoQ reguliert [113] [15]. Die orale Infektion mit dieser stark attenuierten Mutante von Wildtyp- und IL10-/- Mäusen deutete eine wesentliche Rolle einer oder mehrere dieser Virulenzfaktoren für die IL-10 abhängige Entzündungsreaktion an. Mit Einzelmutanten im $\Delta aroA$ - Δasd -Hintergrund konnten die PhoP gesteuerten Gene ausgeschlossen werden. Bezüglich der beiden T3SS zeigten nur die SPI-1 sekretierten Effektoren in Bezug auf IL-10 differentielle Effekte. Ebenso wie die über PhoP/Q kontrollierten Gene konnten die SPI-2 Proteine ausgegrenzt werden. Die Funktion von SPI-2 bei der Kolonisierung der PP und beim intrazellulären Überleben in Makrophagen ist unerlässlich für die systemische Verbreitung. In der frühen Infektionsphase jedoch spielen die SPI-Effektoren offenbar eine eher untergeordnete Rolle und sind kein effektiver Induktor für die IL-10 vermittelte Drosselung der Immunantwort [72] [38].

Die SPI-1 Virulenzfaktoren können direkt PMN-Infiltration induzieren und sind vor allem bei der Invasion der Salmonellen in die Wirtszellen von Bedeutung. Deshalb werden sie zu einem sehr frühen Zeitpunkt während der Infektion produziert und sezerniert. Auch wenn in Rindermodellen gezeigt werden konnte, dass durch eine Mutation in *invH* (kein intakter SPI-1-T3SS, wie bei $\Delta invG$) die Salmonellen nicht in die PP und das Epithel eindringen können und somit eine Induktion der PMN-Rekrutierung verhindern [207] [2], zeigten doch andere Studien, dass die Invasionsgene nicht zwingend notwendig sind, um die epitheliale Barriere zu überwinden [139]. In dem hier entwickelten Modell ermöglicht die hohe Infektionsdosis die Penetration der Bakterien in die PP. Denn obwohl Martinoli et al. zeigten, dass die SPI-1 sekretierten Effektoren für die Invasion in die PP notwendig sind [124], konnte doch Y. Willer demonstrieren, dass durch eine hohe Dosis des Erregers eine Vielzahl an Bakterien indirekt über die M-Zellen der PP eindringen können und deren Invasionsproteine nicht benötigen

[210]. Beim überschreiten eines Schwellenwertes induziert die hohe bakterielle Last, ganz gleich ob es sich dabei um Kommensale (*E. coli* Nissle), tote oder stark attenuierte Formen eines Pathogens (*Salmonella* Typhimurium) handelt, eine initiale Entzündungsreaktion in den PP, welche die Rekrutierung von phagozytierenden Leukozyten in das betroffene Gewebe einleitet. Die $\Delta invG$ -Einzelmutante konnte diese anfängliche Entzündungsreaktion in C57BL/6J-Mäusen ebenfalls auslösen. In den IL-10 defizienten Tieren kam es jedoch wie schon bei der Dreifachmutante nicht zu einer verstärkten Neutrophileninfiltration. Das deutet auf eine entscheidende Rolle der SPI-1 Virulenzfaktoren bei der Induktion der IL-10 regulierten Immunantwort hin. Demnach provozieren über die SPI-1 Translokationssysteme sekretierten Effektoren im Fall des Pathogens *S. Typhimurium* eine IL-10 abhängige Reduktion der PMN Infiltration.

Verschiedene SPI-1 Proteine initiieren in den Zielzellen die Produktion von Chemoattraktanten wie IL-8 und PEEC deren Aufgabe die Induktion der Migration von Neutrophilen in das infizierte Gewebe ist [196] [187]. Maushomologe dieser Chemokine sind MIP-2 und CINC/KC [126]. In der $\Delta invG$ -Mutante fehlen diese Komponenten, was die verringerte Rekrutierung an PMN in IL10^{-/-} nach der Infektion erklären könnte. Über SPI-1 T3SS sekretierte Proteine wie SopE2, SopC, SopD und SipA lösen in den Epithelzellen das Ruffling aus und induzieren somit die Internalisierung. Durch ein weiteres Protein, SptP, wird anschließend wieder das Rearrangieren des Zytoskeletts eingeleitet. Dieser Vorgang ist somit transient und ca. 1 bis 4 Stunden nach der oralen Infektion haben die Salmonellen die epitheliale Barriere durchbrochen, werden aufgenommen und befinden sich dann in Makrophagen und Neutrophilen der Lamina Propria [51] [219]. Das könnte Nachwirkungen haben, die bei IL-10 Mangel zu langanhaltenden Entzündungen führt.

Zusammen mit SipC wurde SipB als Homolog zu den *Shigella*-Invasionsproteinen IpaC und IpaB im Überstand von *S. Typhimurium*, nach Wachstum in Invasionskompetentem Medium, entdeckt [91]. Obwohl beide Pathogene verschiedene Invasionswege nutzen, greifen sie auf die Injektion von Effektoren über T3SS zurück, um in die Zielzellen des Wirts zu gelangen. Weiterhin werden diese Translokationssysteme noch von anderen Pathogenen wie *Yersinia* spp. und *Pseudomonas* spp. verwendet. Die Funktion von *sipB* liegt in der Aktivierung des Inflammasoms und somit des Enzyms Caspase-1 nach Eindringen in die Makrophagen [110]. Über einen IL-1 β und IL-18 gekennzeichneten Signalweg wird in diesen infizierten Makrophagen ein rascher programmierter Zelltod ausgelöst, der makroskopisch Merkmale von Apoptose und Nekrose aufweist [77]. Über den Caspase-1 Signalweg sind Salmonellen auch für die schnelle Apoptose DCs verantwortlich [200]. Daneben ist SipB auch essentiell für die Translokation aller SPI-1 Effektoren [134]. Somit ist SipB ein wichtiger Faktor der Salmonellenvirulenz. Nach oraler Infektion mit der $\Delta sipB$ -Mutante kam es, in IL10^{-/-} gegenüber Wildtypmäusen eine leicht erhöhte PMN-Zahl, welche um das ca. 5 fache geringer ist, als im Fall der Δasd -Mutante. Das Protein SipB ist somit fast allein für das hohe

pro-inflammatorische Potential von Salmonellen im IL-10-Modell verantwortlich zu sein. Die geringe Erhöhung gegenüber Wildtypmäusen könnte auf anderen Faktoren beruhen. Ohne SipB kam es nicht zur Aktivierung des Inflammasoms und somit nicht zur Induktion pro-inflammatorischer Regulatoren. Der Weg über das Inflammasom von Makrophagen und/oder Neutrophilen ist notwendig um die IL-10 regulierte Immunantwort auszulösen. Wie Lara-Tejero et al. zeigen konnten, sind wider erwarten Caspase1^{-/-} Mutanten susceptibler gegenüber einer Salmonelleninfektion als der Wildtyp. Die über das Inflammasom aktivierte Zerstörung von Makrophagen ist zwar nicht notwendig für die systemische Ausbreitung der Bakterien [110], jedoch für die IL-10 vermittelte Begrenzung der Immunantwort.

Das Ausschalten eines zentralen Effektors bei intaktem SPI-1 T3SS führte zu einer signifikanten Reduktion der Neutrophilen Infiltration in IL-10 defizienten Tieren. Durch seine entscheidende Mitwirkung bei der Translokation anderer Effektoren über das SPI-1 T3SS zeigte diese Mutante, dass einer oder mehrere der darüber translozierten Proteine als potente Induktoren einer IL-10 regulierten frühen Immunantwort gelten. Weitere Mutationen in den betroffenen Genen sollten in Zukunft helfen, die Zielproteine näher einzugrenzen. Aufgrund der Redundanz dieser Faktoren werden wahrscheinlich Mehrfachmutanten nötig sein. Sollte ein essentieller Effektor gefunden werden, könnte dies ein neues Modell darstellen, um die Effektivität von Virulenzfaktoren diverser Pathogene zu überprüfen. Mittels Überexpression verschiedener Kandidaten, wie Yop und Ipa von *Yersinia* spp. und *Shigella* spp. oder Virulenzfaktoren enteropathogener *E. coli*-Spezies diesem avirulenten Stamm mit anschließender oraler Infektion von IL10^{-/-}, könnte anhand der PMN Rekrutierung deren Bedeutung bei der Induktion einer Entzündungsreaktion, welche durch IL-10 begrenzt wird, analysiert werden. Dieses Modell bietet dann nicht nur Möglichkeiten für *in vivo* Analysen sondern ebenso für *in vitro* Experimente.

5.5 Essentielle Rolle des Toll-like Rezeptors 4?

Auf der Seite der in die Wirtsgewebe eindringenden Bakterien konnte damit ein wichtiger Faktor identifiziert werden, der an der Induktion einer verstärkten Immunantwort maßgeblich beteiligt ist. Um ein detaillierteres Verständnis der Wirt-Pathogen-Interaktion zu bekommen, sollte neben der Seite der Bakterien auch die Wirtseite untersucht werden.

Zur Auslösung einer Kolitis bedarf es bei IL-10 defizienten Tieren anders als bei IL2^{-/-} einem intakten TLR-MyD88 Signalweg [156]. Das Erkennen von MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*) durch TLRs ist essentiell, um eine Immunantwort über das Signalamolekül MyD88 einzuleiten. Das Hauptoberflächenmolekül pathogener und nicht-pathogener Gram-negativer Bakterien ist LPS, der Ligand von TLR4. Während MyD88-

/- IL10-/- Doppelmutanten selbst nach 1,5 Jahren keine klinischen Symptome einer Kolitis aufweisen, ist sie in TLR4-/- IL10-/- Doppelmutanten nur verzögert [156] [98]. Weitere TLRs die andere MAMPs von Bakterien, wie Flagellin (TLR5) [216] [194] und CpG-DNA (TLR9) [194] erkennen, wirken ergänzend für die Einleitung des Signalwegs über MyD88. Durch den Verlust des Signal-Adaptormoleküls entwickeln auch IL-10 defiziente Tiere keine chronische Entzündung des Darms mehr. Eine Subspezies des Mauseinzuchtstammes C3H (C3H/HeJ) hat einen natürlichen Defekt im Gen für TLR4 [153] [172]. Durch 10 QTLs (*quantitative trait loci*) ist der C3H-Stamm susceptibler für eine Kolitis als der hier verwendete C57BL/6J Inzuchtstamm [42]. Mit dem IL-10 Defekt im genetischen Hintergrund der Subspezies C3H/HeJ entwickeln diese Tiere ähnlich wie TLR4-/- IL10-/- Doppelmutanten in anderen genetischen Hintergründen erst nach längerer Zeit pathophysiologische Merkmale einer Kolitis [156]. Die hier verwendeten Tiere zeigten nach oraler Infektion mit der attenuierten Salmonellenmutante keine Entzündungsreaktion. Im Fall von C3H/HeJ könnte die Erkennung der Bakterien durch TLR4 entscheidend sein, um in IL10-/- eine frühe angeborene Entzündungsreaktion auszulösen. Die Ergebnisse würden dann in Einklang stehen mit Ergebnissen aus Kolitis-Experimenten und auch Versuche für die angeborene Immunität, welche beide eine essentielle Rolle von TLR4 erkennen lassen [210] [156]. Nicht auszuschließen ist in diesem Fall jedoch, dass andere Merkmale als das Fehlen von TLR4, die C57BL/6J von C3H/HeJ unterscheiden, ebenfalls zu den unterschiedlichen Reaktionen beitragen. Der genaue Anteil von TLR4 könnte in weiteren Untersuchungen mit IL-10-/- TLR4-/- Tieren geklärt werden.

5.6 Das IL-10 Netzwerk: Entscheidende Rolle von T-Zellen bei einer Th1-dominierten Immunantwort

Die Erkennung mikrobieller Faktoren spielt eine entscheidende Rolle bei der Einleitung einer Entzündungsreaktion. Die eindringenden Mikroorganismen werden von Epithel- und Antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen. Zu den letztgenannten gehören die DCs und Makrophagen. Während die Hauptaufgabe der DCs in der Präsentation der Antigene liegt, um nach Kontakt mit T-Zellen unter zu Hilfenahme von Zytokinen eine Th1 oder Th2-Antwort zu bewirken, besteht die Rolle von Makrophagen hauptsächlich in der Aufnahme und Zerstörung von Mikroorganismen. Während der frühen Immunantwort ist die Zahl spezifischer T- und B-Zellen noch sehr niedrig, so dass sie hier eine möglicherweise untergeordnete Rolle spielen. Zelltypspezifische Deletionen von IL-10 bzw. vom IL-10 Rezeptor sollten zeigen, welcher Zelltyp der Hauptproduzent oder das Ziel dieses Zytokins und somit für die Drosselung der frühen Immunantwort gegen Salmonellen essentiell ist.

DISKUSSION

Die Gruppe von Roers und Müller et al. konnte zeigen, dass T-Zellen für die Produktion von IL-10 in der adaptiven Immunantwort maßgeblich sind, für die frühe angeborene Immunantwort bei endotoxischen Schock jedoch keine mit dem Komplet-*knock-out* vergleichbare Reaktion zeigten [169]. In einem weiteren Versuch konnten sie jedoch demonstrieren, dass die frühe Immunantwort gegen LPS von IL-10, welches von Makrophagen und/ oder Neutrophilen produziert wird, abhängig ist [186]. In dieser Arbeit zeigte die Infektion von T-Zell- und Makrophagenspezifischen IL-10 *knock-outs* jedoch, dass keiner dieser Zelltypen als Produzenten von IL-10 in der frühen Phase der Infektion relevant ist. Während Roers et al. die Immunreaktion nach subkutaner Injektion mit LPS beobachteten, wurde in diesem Modell die Induktion einer Entzündungsreaktion in den PP des Darms betrachtet und keine systemisch Ausbreitung. Dies könnte für die unterschiedliche Reaktion verantwortlich sein. Durch die vielen Immunzellen der PP mit konstitutiver IL-10 Expression existiert dort ein gewisses Grund-Niveau an IL-10, welches die Rolle einzelner Zelltypen überdecken könnte.

T- und B-Zellen, sowie Makrophagen, wurden über zelltypspezifische IL-10 Rezeptor *knock-outs* weiterhin in ihrer Rolle als Empfänger des IL-10 Signals getestet. Zuvor wurde der ubiquitäre *knock-out* des IL-10 Rezeptors getestet, da die IL-10R2-Untereinheit des IL-10 Rezeptors strukturelle Übereinstimmungen mit den Rezeptoren anderer Zytokine, wie IL-22, IL-26 und IFN- λ aufweist [29]. Daher stellte sich die Frage, ob IL-10 bei Verlust seines Rezeptors alternativ an diese anderen Rezeptoren binden kann. Eine vergleichbare Erhöhung der PMN Zahl in den PP nach oraler Infektion von IL-10 Rezeptor defizienten Tieren (IL10R-/-) wie bei IL10-/- zeigte jedoch, dass hier keine Redundanz vorliegt und der IL-10 Rezeptor für das Erkennen von IL-10 zur Begrenzung der Entzündungsreaktion essentiell für die Herunterregulierung der Immunantwort ist. Zelltyp-spezifische IL-10 Rezeptor *knock-outs* konnten somit verwendet werden um wichtige IL-10 Zielzellen in diesem Prozess der frühen Immunantwort zu identifizieren.

Allerdings zeigte keine dieser Mausmutanten eine erhöhte PMN Infiltration, verglichen mit dem Komplet-*knock-out*. Jedoch waren die verwendeten IL-10 Rezeptortiere noch nicht vollständig zurückgekreuzt. Durch den gemischten genetischen Hintergrund kann die Wirkung der des IL10R-/- maskiert werden. Eine Wiederholung des Experiments mit vollständig zurückgekreuzten Tieren wäre deshalb sinnvoll. Der im Makrophagenspezifischen *knock-out* verwendete LysM-Promotor für die Cre-Rekombinase ist auch in Neutrophilen aktiv. Demnach fehlt in dieser Cre-Linie nicht nur IL-10 bzw. der IL-10 Rezeptor in den Makrophagen, sondern ebenfalls in Neutrophilen. Die Neutrophilen werden demnach nicht direkt durch IL-10 in ihrer Infiltration moduliert, sondern offenbar nur indirekt über andere Zelltypen. Von den getesteten Zelltypen konnte keiner als essentiell identifiziert werden. Nicht auszuschließen ist, dass erst ein Doppel-*knock-out* des IL-10 Rezeptors in verschiedenen Zelltypen die gemeinsam reagieren zum Erfolg führt. Die konstitutive Expression

von IL-10 in den T- und B-Zellen und den wenigen Makrophagen führt zu einem geringen Grundlevel dieses Zytokins in den PP. Dadurch kann IL-10 schnell das homöostatische Gleichgewicht regulieren. Diese Tatsache kann jedoch die Bedeutung einzelner Zelltypen maskieren. Ebenso blieb bisher die Rolle von DCs und Epithelzellen ungeklärt, da im Rahmen dieser Arbeit keine zelltypspezifischen *knock-outs* zur Verfügung standen. Mit Hilfe eines *knock-outs* bei dem IL-10 spezifisch in allen Zellen der Hämatopoetischen Linie fehlt, könnte die Rolle der Epithelzellen näher charakterisiert werden. Geeignet dafür wäre der induzierbare Mx1-Promotor. Dieser ist in gesunden Tieren inaktiv, kann aber durch die Injektion von IFN- α oder IFN- β aktiviert werden. Alternativ wären Knochenmarktransfers nach letaler Bestrahlung zwischen IL-10 defizienten und IL-10 profizienten Tieren sinnvoll.

Als Folge der Translokation von Kommensalen in die PP werden naive T-Zellen nach Kontakt mit DCs über spezielle Zytokine dazu veranlasst, in IL-10 produzierende regulatorische T-Zellen und/oder Th3 Zellen zu differenzieren. Bei der Induktion einer Immunantwort gegen pathogene Mikroorganismen werden pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-12 freigesetzt, die eine Th1 Antwort auslösen. IL-4 dagegen stimuliert eine Th2-Antwort, bei der B-Zellen zur Differenzierung angeregt werden. Um die Immunantwort gegenüber einem Pathogen zu begrenzen und zerstörerische Immunpathologie zu vermeiden, werden bei einer Infektion ebenfalls Treg gebildet. Alternativ gereifte DCs sekretieren dann IL-10, um IL-10 produzierende Treg zu induzieren, welche für die mukosale Toleranz entscheidend sind. Der T-Zellspezifische *knock-out* von IL-10 deutete jedoch keine maßgebliche Rolle der T-Zellen an. IL-10 hat sowohl auf die Th1, als auch auf die Th2 Antwort eine regulierende Wirkung.

In T-Zellspezifischen *knock-outs* von IL-10 mit zusätzlichen Defekt in IL-4 bzw. IL-12 sollte die Rolle von T-Zell-produziertem IL-10 bei einer Th1 bzw. Th2 dominierten Immunantwort demonstriert werden. Während durch den Verlust von IL-4 eine Th1- Antwort bevorzugt wird, bedeutet das Fehlen von IL-12 eine Verschiebung in Richtung Th2. Everest et al. zeigten eine essentielle Rolle von IL-4 nach *Salmonella* Typhimurium Infektion in der adaptiven Immunantwort [37]. Nach Infektion mit apathogenen Salmonellen kommt es in den IL12-/- defizienten Tieren zu keiner erhöhten Entzündungsreaktion. Obwohl der zelltypspezifische *knock-out* von IL-10 in den T-Zellen alleine keine Auswirkungen zeigte, ist T-Zell-produziertes IL-10 bei Fehlen von IL-4 für das Herunterregulieren der Entzündungsreaktion essentiell. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen von M. Greweling und N. Fasnacht [61] [44]. Beide konnten in verschiedenen Modellen zeigen, das T-Zell-produziertes IL-10 notwendig ist, um eine durch den Verlust von IL-4 erhöhte Th1-Antwort zu kontrollieren. Während M. Greweling dafür ein DSS-Kolitis-Modell einsetzte, konnte N. Fasnacht diesen Effekt über orale Infektion mit dem pathogenen Nematoden *Trichuris muris* erzielen. Damit konnte gezeigt werden, dass von T-Zellen gebildetes IL-10 sowohl bei der Regulierung der frühen angeborenen, als auch in der späten adaptierten Immunantwort in diesem Modell von Bedeutung ist.

5.7 IL-10 notwendig für die Ausbildung einer Toleranz

Wie schon zuvor erwähnt, löst auch eine Infektion mit probiotischem *E. coli* eine anfängliche Entzündungsreaktion aus. Die wiederholte Verabreichung hat jedoch einen schützenden Effekt, sogar gegenüber einer anschließenden Infektion mit Salmonellen [210]. Die schützende Wirkung von IL-10 in der Ausbildung dieser Art von oralen Toleranz sollte über Mehrfachinfektion von Wildtypmäusen und IL-10 defizienten Tieren mit der apathogenen *Salmonella*-Mutante charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden C57BL/6J und IL10^{-/-} Mäuse vier Mal im Abstand von je einer Woche infiziert. Einen Tag nach der letzten Verabreichung wurden die PP isoliert und die Zahl an Neutrophilen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Als Kontrolle dienten C57BL/6J und IL10^{-/-} Tiere, welche nur die letzte Dosis erhielten. Die wiederholte Infektion mit der Δasd -Mutante löste in den Wildtypmäusen eine signifikante Toleranz aus, sichtbar an der weitaus geringeren Zahl an Neutrophilen verglichen mit einer Einfachinfektion. Dieses Resultat konnte indessen nicht in den IL-10 defizienten Tieren beobachtet werden. Durchschnittlich war die Neutrophileninfiltration nach der viermaligen Applikation sogar noch leicht verstärkt. Für die immunsuppressive Wirkung von regulatorischen T-Zellen scheint IL-10 essentiell zu sein, dies würde die von Rubtsov et al. kürzlich publizierten Ergebnisse bestätigen [171]. Auch wenn der beobachtete Effekt mit großer Wahrscheinlichkeit auf Treg zurückzuführen ist, sollte dies durch weitere Versuche bestätigt werden, zum Beispiel mit einem ubiquitären *knock-out* von IL-4 mit zusätzlichem zelltypspezifischem *knock-out* von IL-10 in Treg (CD4, FoxP3). Belkaid et al. zeigten, dass die *in vivo* Kontrolle von einer Infektion mit *Leishmania* über regulatorische T-Zellen reguliert wird, und dabei sowohl über IL-10 abhängige, wie auch über IL-10 unabhängige Signalwege [5]. Die hier erzielten Daten lassen bei einer Infektion mit *Salmonella* jedoch nur auf einen IL-10 abhängigen Weg schließen.

5.8 Abschließende Bemerkung

In diesem Infektionsmodell für die frühe angeborene Immunantwort konnte gezeigt werden, dass IL-10 essentiell ist, um eine erhöhte Entzündungsreaktion gegenüber oral applizierten avirulenten Salmonellen zu begrenzen. Für diesen Effekt sind bestimmte sekretierte Virulenzfaktoren von *Salmonella* verantwortlich, da weder ein kommensaler *E. coli* noch abgetötete Salmonellen in der Lage waren eine vergleichbare Reaktion auszulösen. Auch potente Faktoren wie Flagellen spielen in der IL-10 regulierten Immunantwort keine Rolle. Durch das in dieser Arbeit entwickelte Infektionsmodell ließen sich die Stimulatoren der Entzündungsreaktion auf die über die SPI-1 T3SS und SipB translozierten Effektoren begrenzen. Es konnte hierbei aber nicht nur die Seite der Bakterien, sondern auch die Wirts-

DISKUSSION

seite untersucht werden. Zelltypspezifische IL-10^{-/-} und IL-10R^{-/-} wurden verwendet, um wichtige Zelltypen in diesem Prozess der IL-10 regulierten angeborenen Immunantwort zu untersuchen, jedoch ohne Erfolg. Nur wenn durch einen zusätzlichen Verlust von IL-4 die Immunantwort in Richtung Th1 polarisiert wird, zeigt sich eine entscheidende Rolle von T-Zell-produziertem IL-10. Außerdem konnte durch Mehrfachinfektionen gezeigt werden, dass IL-10 für die Ausbildung einer „Toleranz“ notwendig ist.

Teil 2

Wirt-Pathogen-Interaktion während der Persistenz

6. Einleitung

Viele wichtige Pathogene wie *Brucellae*, *Mycobacteriae* und *Salmonellae* haben die Fähigkeit, latente oder persistierende Infektionen zu etablieren [164]. Obwohl der Wirt durch das Zusammenspiel der frühen angeborenen mit der späten adaptiven Immunantwort eine Infektion mit diesen Pathogenen überstehen kann, sind einige Pathogene in der Lage, innerhalb von Wirtszellen zu überleben und über Monate und Jahre zu überdauern. Durch ihre Inaktivität wird keine erneute Immunreaktion ausgelöst mit der Folge, dass sie nicht vollständig beseitigt werden. Bei Immunsuppression des Wirtes kann es jedoch zu einem erneuten Ausbruch der Infektion kommen. Um das Ausbilden dieser sogenannten Persister zu verhindern, sollten akute bakterielle Infektionen ausführlich mit Antibiotika behandelt werden. Sind die bakteriellen Erreger jedoch erst einmal in diesem dormanten Zustand, sind die meisten Antibiotika wirkungslos, da diese fast ausschließlich aktive Prozesse der Zelle inhibieren und deshalb dormante Pathogene nicht schädigen. Um gegen die Persister effektiv vorgehen zu können, ist es wichtig zu ermitteln, ob gewisse Aktivitäten auch für Persister wichtig sind und deshalb geeignete Targets für entsprechende Antiinfektiva darstellen könnten. Aus diesem Grund soll in dem zweiten Teilprojekt anhand von *Salmonella* Typhimurium ein Infektionsmodell etabliert werden, mit dessen Hilfe die Wirt-Pathogen-Interaktion bei Salmonellenpersistenz untersucht werden kann.

6.1 *Salmonella*-Infektionen

Salmonella enterica Spezies sind fakultativ intrazelluläre Erreger, die sowohl akute als auch persistierende Infektionen hervorrufen können [133]. Das Pathogen *Salmonella enterica* umfasst ca. 2500 Serotypen [12] [154]. Zu diesen zählen die klinisch relevanten Serotypen Enteritides, Typhimurium, Typhi und Paratyphi. Während das Wirtsspektrum der nicht-typhoidalen *Salmonella*-Stämme *S. Enteritides* und *S. Typhimurium* auch Geflügel, Rinder, Schweine und Nager umfasst, beschränken sich die Typhus-Stämme auf Mensch und Primate [148] [150]. Genetisch unterscheiden sich die Serotypen Typhimurium und Typhus in 10% ihrer Gene [215].

Eine Infektion mit *S. Enteritidis* oder *S. Typhimurium* ist für den Menschen auf den Darm und die mesenterialen Lymphknoten begrenzt und zusammen verursachen sie über 90% aller Salmonellosen [144]. Bei Kleinkindern, älteren oder immungeschwächten Individuen, wie z.B. durch HIV-Infektion, können sie sich allerdings auch systemisch ausbreiten. Innerhalb von 12-72h nach Verzehr kontaminierter Nahrungsmittel wie Eiern, Geflügel oder Fleischprodukte manifestiert sich die Gastroenteritis. Symptome wie Übelkeit, Brechreiz und Durchfälle werden dabei von krampfartigen Bauchschmerzen begleitet. Durchfall entsteht durch erhöhte Chlorid-Ionen-Sekretion und vermehrte Flüssigkeitsabgabe in das Darmlumen über das zerstörte Epithel [149]. Dafür verantwortlich sind gewebezerstörenden Substanzen, die von rekrutierten Neutrophilen als Reaktion auf die Infektion ausgeschüttet wurden [25] [129] [141] [178] [220]. Nach einer Woche sind die Patienten jedoch zumeist wieder beschwerdefrei. Jährlich treten ca. 1,3 Milliarden Fälle von Gastroenteritiden auf, die durch nicht-typhöse Salmonellen verursacht werden, 300.000 davon enden letal [148] [150]. Durch mangelnde Hygienemaßnahmen treten sie vor allem gehäuft in den Entwicklungsländern Afrikas, Asiens oder Lateinamerikas auf.

Die auf Menschen und höhere Primaten spezialisierten *Salmonella enterica*-Serovare Typhus und Paratyphus A-C sind für den Ausbruch von typhoidalem Fieber verantwortlich. In Teilen der Welt mit ungenügender Trinkwasserqualität können Infektionen mit diesen Erregern endemisch werden und verursachen hohe Morbidität und Mortalität. Nach oraler Infektion über kontaminierte Lebensmittel oder verunreinigtes Trinkwasser dringen die Salmonellen primär über die M-Zellen in den PP des Darms in das mukosale Gewebe ein. Daneben werden Salmonellen auch von Dendritischen Zellen, welche die Epithelbarriere teilweise durchdringen, aufgenommen [88] [140] [160]. Nach Aufnahme in das Retikuloendotheliale System (RES), welches Phagozyten, Fibroblasten und retikuläre Bindegewebszellen umfasst, verbreitet sich die Infektion auf innere Organe, wie Leber und Milz, in denen sich die Salmonellen dann vorwiegend in Makrophagen vermehren [166]. Die Folge ist eine Hypertrophie des RES, einschließlich der PP, mLN, Milz, Leber und Knochenmark. Durch die Kolonisierung der Bakterien in diesen Geweben kommt es neben einer diffusen Enteritis zu Blutungen, Nekrosen, Ulzerationen und intestinalen Perforation [144] [178]. Die Patienten leiden unter anderem unter Kopf- und Gliederschmerzen, Verstopfung mit nachfolgenden erbsenbreiartigen Durchfällen, hohem Fieber, Hauteffloreszenzen, Benommenheit und abdominalen Krämpfen. Bleibt die Krankheit unbehandelt, dauert sie ca. 4 Wochen mit einer Mortalitätsrate von 10-15%, wovon vor allem Kinder betroffen sind. Nach Schätzungen der WHO treten jährlich 22 Millionen Fälle von Typhus auf, 200.000 davon mit tödlichem Verlauf [23]. Einige der infizierten Individuen (ca. 2-5%) werden lebenslänglich Träger und scheiden periodisch größere Mengen an diesen Bakterien mit ihrem Stuhl und Urin aus. Chronische Ausscheider gibt es auch beim Menschen, welche nie klinische Symptome einer Infektion zeigten. Andere Patienten mit Antibiotikabehandlung werden wenige Monate nach der

initialen Infektion rückfällig [205]. Das deutet auf die Präsenz von Persistenz innerhalb der Bakterienpopulation hin. Für ein Pathogen mit sehr begrenztem Wirtsspektrum unterstützen chronische Ausscheider entscheidend die Transmission, für die allgemeine Gesundheitspflege sind sie dagegen von größter Besorgnis. Individuen, die chronischer Träger von *S. Typhi* sind, haben zudem ein erhöhtes Risiko an Leberkrebs zu erkranken [185]. Interessant ist jedoch, dass chronisch infizierte Mäuse (avirulenter Salmonellenstamm $\Delta agfA$) immun gegen eine Infektion mit virulenten Wildtyp *S. Typhimurium* sind [191] [133] [164].

6.2 Chronische Infektionen - Persister

Bei einem geringen Anteil akuter Infektionen überleben einige der pathogenen Erreger und verursachen persistierende und teilweise lebenslängliche Infektionen [133]. Obwohl das adaptive Immunsystem durch die humorale und die zellulär vermittelte Immunantwort spezifisch auf den Fremdkörper reagieren kann und dabei vom angeborenen Immunsystem unterstützt wird, welches MAMPs (*microbe-associated patterns*) über die PRRs (*pattern recognition receptors*) erkennt, überdauern persistierende Pathogene. Das genaue Verständnis der Interaktion vom Wirt mit dem Pathogen, die dies ermöglicht, ist ein wichtiger Bestandteil heutiger Forschung. Einige Mechanismen, die von Pathogenen verwendet werden, um die Persistenz zu erhöhen, sind bekannt und in der folgenden Tabelle aufgeführt (adaptiert nach [215]). Selbst phylogenetisch nicht miteinander verwandte Bakterien teilen ähnliche Strategien der Persistenz. In einigen Fällen können treten sogar homologe Persistenz-Gene auf. Jene Beobachtungen deuten eher auf eine spezifische Phase der Pathogenese hin, als auf ein zufälliges Ungleichgewicht der Wirt-Pathogen-Interaktion.

| Mechanismen | Bsp Pathogen | Bemerkung |
|---------------------------------|--------------------------|---|
| Antigenvariation | <i>N. meningitides</i> | Bakterien verändern ihre Oberflächenantigene durch DNA- |
| | <i>N. gonorrhea</i> | Inversionen oder effizientem |
| | <i>B. burgdorferi</i> | horizontalem Gentransfer |
| | <i>B. fragilis</i> | |
| Kolonisierung bestimmter Organe | <i>S. enterica</i> Typhi | persistiert im RES, vor allem Gewebe und im Knochenmark, chronisch auf Gallensteinen in der Gallenblase |
| | <i>M. leprae</i> | kolonisiert das Nervensystem |
| | <i>H. pylori</i> | überlebt im Magen in Schichten jenseits der Epithelbarriere |
| | | |
| Wirt-Mimikry | <i>N. gonorrhea</i> | Änderung des LPS |
| | <i>N. meningitides</i> | Mimikry der Wirtspolysaccharide |

EINLEITUNG

| | | |
|--|--------------------------|--------------------------------------|
| | <i>T. pallidum</i> | Umhüllen mit Wirtsproteinen |
| Resistenz gegenüber | <i>B. pseudomallei</i> | Resistenz gegenüber Phagozyten |
| Effektoren des Immunsystems | <i>M. tuberculosis</i> | Persistenz in Makrophagen |
| Modifizierung der intrazellulären Umgebung | <i>S. enterica</i> Typhi | verhindert Phagolysosomenver- |
| | <i>Brucella</i> Spezies | einigung und modifiziert die |
| | <i>M. tuberculosis</i> | Vakuole |
| | <i>Chlamydia</i> Spezies | Etablierung eines obligat intra- |
| | | zellulären Lebenszyklus |
| Selektive Geninaktivierung | <i>M. leprae</i> | Verlust von Genen und Ansammlung |
| | | von Pseudogenen gegenüber |
| | | <i>M. tuberculosis</i> ; |
| | | Reduktion der Replikationsrate und |
| | | der metabolischen Aktivität |
| | <i>S. enterica</i> Typhi | Verlust von Anheftungsfaktoren und |
| | | Proteinen für den intrazellulären |
| | | Lebensstil -; fördert Aufnahme durch |
| | | spezielle Zellen und somit die sys- |
| | | temische Verbreitung und Persistenz |

Da der Fokus dieser Arbeit auf dem Salmonelleninfektionsmodell liegt, wird im Folgenden der Vorgang der Persistenz anhand von *Salmonella* Typhimurium, dem Erreger typhoidalem Fiebers in der Maus, näher betrachtet.

6.2.1 Systemische Ausbreitung von *Salmonella* Typhimurium in der Maus

Die Haupteintrittspforte für *Salmonella* Typhimurium in die Mukosa sind die M-Zellen der Peyerschen Platten. Die Bakterien werden daneben auch von Dendritischen Zellen in der Lamina Propria aufgenommen [8]. Die Erkennung von Salmonellen-MAMPs führt zur Induktion einer Entzündungsreaktion mit Rekrutierung von Leukozyten zur Vernichtung des bakteriellen Erregers. Jedoch können sie sich über diese im Wirt systemisch ausbreiten. In infizierten Phagozyten gelangen die Salmonellen über Lymph- und Blutbahnen in die mesenterialen Lymphknoten und von dort aus in Leber und Milz und können in Knochenmark und Gallenblase persistieren. Bei einer kurzzeitig andauernden Persistenzperiode (über mehrere Monate) von *S. Typhi* überdauern diese in unreifen Immunzellen im Knochenmark. Daneben besiedeln sie Gallensteine in der Gallenblase, von wo aus sie kontinuierlich über

die Gallenflüssigkeit in den Darm gelangen [133]. Nicht bekannt ist, wie die Salmonellen neue Makrophagen infizieren können. In einer Hypothese werden sie nach Ende der Lebensdauer der Makrophagen von neuen aufgenommen. Eine andere Hypothese besagt, dass die Salmonellen in den Makrophagen Apoptose induzieren und die toten oder sterbenden Makrophagen dann anschließend von frisch rekrutierten Phagozyten aufgenommen werden. Richter-Dahlfors et al. konnten zeigen, dass die Bakterien eine zytotoxische Wirkung auf phagozytierenden Zellen haben, auch wenn diese keine Erreger enthielten [166].

6.2.2 Überleben von *Salmonella Typhimurium* in Makrophagen

Nach phagozytotischer Aufnahme der Pathogene durch Makrophagen findet in diesen normalerweise eine Verschmelzung des Phagosoms mit Lysosomen zum Phagolysosom statt. Durch die antimikrobiellen Substanzen des Lysosoms und reaktiven Sauerstoffradikalen sowie Stickstoffoxiden werden die Bakterien zerstört. Auch die Ansäuerung des Phagosoms sowie eine Vielzahl an Phagosomproteinen und -peptiden wie proteolytische Enzyme und CAMPs (cathelicidin-related antimicrobial peptide) sind für die Kontrolle der Bakterienreplikation notwendig. *Salmonella* besitzt jedoch spezielle Virulenzfaktoren, welche Resistenz gegenüber diesen Enzymen ermöglichen. Die SPI-2 kodierten Effektoren erlauben es, der letalen Wirkung der NADPH-Oxidase (kodiert in *phox*) in den Makrophagen zu entkommen, sind für die Virulenz bei *phox*-Defizienz jedoch nicht notwendig [203]. Für die Persistenz ist das Überleben der Bakterien in den Wirtszellen ein wichtiger Faktor [19].

6.2.3 Wirtsfaktoren zur Kontrolle der intrazellulären bakteriellen Replikation

Ein wichtiger Wirtsfaktor, welcher die bakterielle Replikation innerhalb von Makrophagen kontrolliert, ist Nramp1 (natural resistance-associated macrophage protein-1, heutiger Name Sdc11a1). Die Suszeptibilität einiger Mausinzuchtstämme gegenüber Infektionen mit intrazellulären Pathogenen wie *Leishmania donovani*, *Mycobacterium bovis* und *Salmonella Typhimurium* ließen sich auf diesen Locus im murinen Genom zurückführen. Nramp1 spielt eine wichtige Rolle bei der Makrophagen/ Pathogen-Interaktion in dem es die Makrophagen aktiviert. Dazu gehört die Hochregulierung von Chemokinen, Zytokinen (TNF- α , IL-1 β) und der MHC-II-Expression, die Freisetzung von Stickstoffoxiden, Antigenprozessierung und Apoptose [11]. Es kodiert für ein integrales Membranprotein, welches in den endosomalen und lysosomalen Kompartimenten lokalisiert ist und den Ionenhaushalt der

Makrophagen reguliert. Intrazellulären Bakterien wird somit der Zugang zu zweiwertigen Ionen wie Eisen entzogen und deren Wachstum beschränkt [49] [63]. Eine Rolle von Nramp1 in humanem Typhus konnte jedoch nicht belegt werden [33]. Wird in Wildtypmäusen, welche chronisch Träger von *S. Typhi* sind, IFN- γ mittels Antikörperbehandlung neutralisiert, zeigen diese Symptome einer akuten systemischen Infektion mit erhöhter bakterieller Vermehrung in einer Vielzahl an Geweben sowie einer erhöhten Ausscheidungsfrequenz [131]. Hier konnten die Beobachtungen auch im Menschen bestätigt werden [78]. Demnach spielt auch IFN- γ bei der Ausbildung der Persistenz eine Rolle.

Nramp1+ Mäuse sind ein gutes Modell für Persistenz, sie wird aber erst nach 4 Wochen erreicht. Infizierte Tiere sterben dagegen auch bei niedrigen Infektionsdosen an virulenten Salmonellen. Persistenz kann hier nur mit abgeschwächten Salmonellenmutanten untersucht werden.

6.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Existenz von Persistenz wirft diverse Fragen auf, z.B.: Wie sieht der metabolische und replikative Zustand der Pathogene während der asymptomatischen Phase aus? Wie schaffen es die Bakterien der Wirtsabwehr zu entkommen oder warum ignoriert das Immunsystem diese Fremdkörper? Um diese Fragestellungen untersuchen zu können, ist ein umfassendes Verständnis der Wirt-Pathogen-Interaktion notwendig. Die Grundlage dieser Analysen ist ein geeignetes Infektionsmodell. Das erste Ziel dieser Arbeit war es mit Hilfe von *Salmonella Typhimurium* ein geeignetes Infektionsmodell zu etablieren, um dann über definierte Mutationen Gene zu identifizieren die für die Persistenz essentiell sind. Die gewonnenen Kenntnisse sollen weiterführend auch dabei helfen, neue Ziele für Antibiotika zu identifizieren.

7. Ergebnisse

Anschließend an eine akute Infektion sind einige bakterielle Pathogene dazu in der Lage, das Immunsystem des Wirts zu umgehen und chronisch zu überdauern. Ein Hauptproblem bei einer Behandlung mit Antibiotika gegen diese Infektionen sind, neben dem Erscheinen von resistenten Mutanten der infektionsauslösenden Bakterien, die so genannten Persister. Diese kleine Bakterien-Subpopulation ist nicht resistent gegenüber dem Antibiotikum, überlebt die Behandlung aber dennoch für weitaus längere Zeit als die Hauptpopulation. Eine Antibiotikabehandlung kann demnach über Monate andauern und bedeutet erhebliche Strapazen für den Patienten. Persister weisen einen umfassenden Rückgang metabolischer Prozesse auf und teilen sich nicht. Auf diese Weise können sie längere Zeit auch unter ungünstigen Bedingungen überdauern [115]. Viele Menschen sind nach einer Infektion, z.B. mit *Salmonella* Typhi, chronischer Träger dieser Bakterien. Die Salmonellen werden in den PP von Makrophagen und/oder DCs aufgenommen, über die Lymph- und Blutbahnen in die mesenterialen Lymphknoten (mLN) transportiert, und breiten sich von da aus weiter in Milz, Knochenmark, Leber und Gallenblase aus. Nachdem die erste Infektionswelle überstanden wurde, können sie für 1 Jahr oder lebenslang in Knochenmark und Gallenblase überdauern, ohne vom Immunsystem attackiert zu werden und klinische Symptome auszulösen [133]. Durch ihren Ruhezustand sind sie gegen die meisten Antibiotika tolerant. Um wirksamere Mittel gegen diese persistierenden Bakterien zu finden, muss untersucht werden, auf welche Art und Weise die Persister im Wirt überleben können, ohne eine Immunreaktion auszulösen und ob und welche metabolischen Wege für die Aufrechterhaltung des Persistenzzustandes wichtig sind.

Ziel dieses Teilprojektes war es, geeignete Persistenzmodelle zu etablieren, um für die Aufrechterhaltung der Persistenz wichtige Prozesse zu identifizieren und somit neue Angriffstellen für Antibiotika gegen persistierende Bakterien zu finden. Des Weiteren sollen diese Modelle die Grundlage schaffen, die Bakterien-Wirt-Interaktion analysieren zu können. Als Modellpathogen wurde *Salmonella* Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) ausgewählt, der Erreger typhoidalem Fiebers in der Maus.

Persister umgehen die toxische Wirkung von Antibiotika, da sie sich in einem dormanten Zustand befinden, in dem alle Prozesse die von den Antibiotika angegriffen werden, nicht

aktiv sind. Der einfachste Weg, Persister zu generieren, wäre demnach mittels Überexpression eines Proteins, das zentrale Prozesse der bakteriellen Zelle abstoppt. Wichtige Beispiele für solche Proteine in Bakterien sind die Toxin/ Antitoxin-Module, welche sowohl plasmidkodiert als auch chromosomal vorkommen.

7.1 Toxin/ Antitoxin-Module

In der Tat konnten Toxin/ Antitoxin-Module (TA-Module) als wichtig für die Persistenz identifiziert werden. Das stabile Toxin-Protein inhibiert essentielle zelluläre Funktionen, wie zum Beispiel Translation oder Replikation. Das instabile Antitoxin neutralisiert den Effekt indem es einen inaktiven Komplex mit dem Toxin bildet [74]. Eine Überexpression des Toxins und die dadurch erreichte transiente Blockierung führt dann zu einer vermehrten Produktion von Persistern. Gut untersuchte Beispiele für Toxin/ Antitoxin-Module in *E. coli* sind RelBE, MazEF und HipBA [74] [58].

7.1.1 Test eines arabinoseinduzierbaren Plasmids

Die ersten Untersuchungen zu Toxin/ Antitoxin-Modulen fanden an HipBA statt. Durch die zytotoxische Wirkung des Toxins HipA schlugen die ersten Versuche einer Überexpression von *hipA* fehl, da der verwendete Promotor zu stark war. Ebenso die Einführung eines *hipA* Plasmids in $\Delta hipB$ Mutanten war nicht möglich [137]. Die ektopische Expression von *hipA* hinter einem induzierbaren Promotor löste dieses Problem. Guzman et al. verwendeten dazu ein pBAD Plasmid [68]. Der im Plasmid enthaltene *ParaC*-Promotor ist L-Arabinose abhängig. Die Zugabe von L-Arabinose ins Wachstumsmedium induziert die Expression des stromabwärtsgelegenen Gens.

Die Funktionsfähigkeit eines solchen Plasmids sollte zuvor mittels GFP-Expression bestätigt werden. Dafür wurde das Gen für das Green Fluorescent Protein (GFP) hinter den Arabinose-abhängigen Promotor im pBAD18-Plasmid kloniert und in SL1344 über Elektrotransformation eingebracht. Durchflusszytometrisch (FACS) konnte die Fluoreszenzstärke ermittelt werden. Die GFP-Klone wurden in normalem LB-Medium für 4h inkubiert, anschließend wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von L-Arabinose (0,1%, 0,2%, 0,5% und 1%) die GFP-Expression induziert. Nach 1h bzw. 2h wurde die Probe mit Formaldehyd fixiert und im FACS ausgewertet.

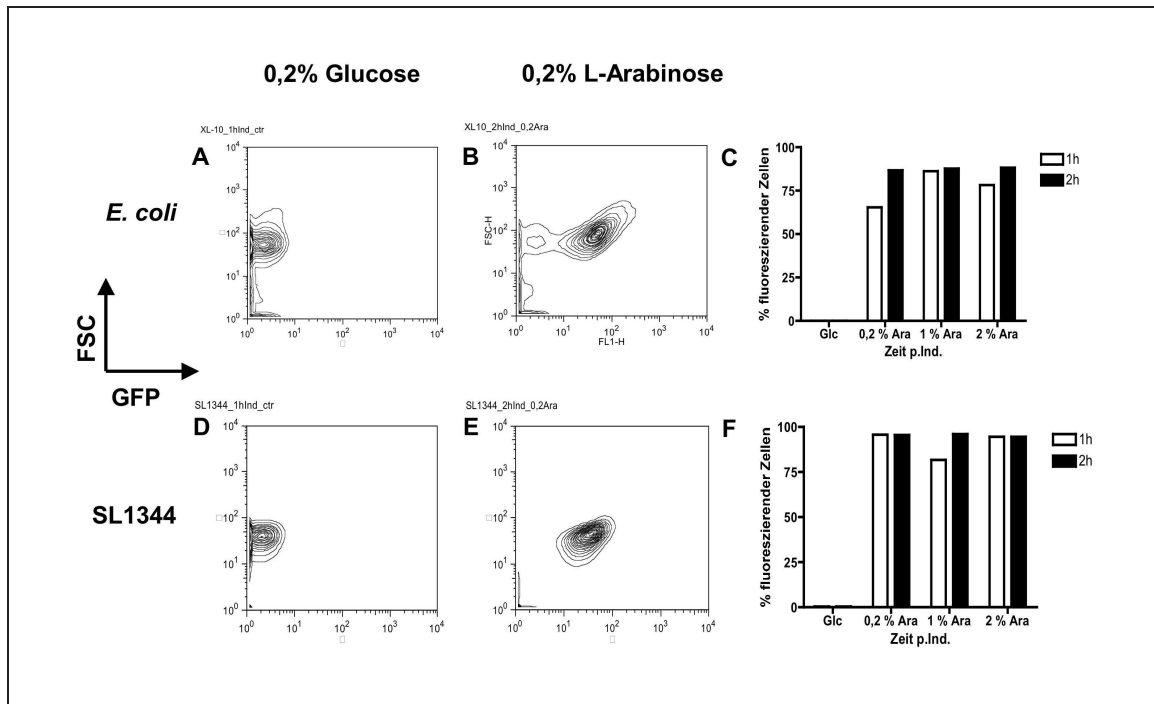


Abbildung 7.1: **FACS-Analyse der GFP-Fluoreszenz von pBAD18GFP nach Induktion mit L-Arabinose.** Das GFP-Plasmid wurde in *E. coli* (A-C) und SL1344 (D-F) eingebracht. Nach 4h wurde mit 0,2%, 1% bzw. 2% L-Arabinose die GFP Produktion induziert. Die Kontrollen erhielten 0,2% Glucose. Nach 1h bzw. 2h wurden Proben entnommen, mit Formalin fixiert und im FACS analysiert. (A, B, D und E) Beispiele für SL1344 und *E. coli* 2h nach Induktion mit L-Arabinose bzw. Glucose. (C und F) Prozentualer Anteil fluoreszierender Zellen bei unterschiedlichen L-Arabinose Konzentrationen.

Die FACS-Analyse zeigte, dass die Expression des GFP in SL1344 nach der Induktion mit L-Arabinose in fast 100% der Zellen erfolgt war, in *E. coli* dagegen durchschnittlich nur in 85% der Zellen. Die Konturen-Blots der FACS-Analyse zeigen die Ergebnisse für 0,2% L-Arabinose, sowie die Kontrolle. Diese Konzentration wurde für die weiteren Experimente verwendet. In dem pBAD Plasmidrückgrat sollte nun die Expression der toxischen Proteine erfolgen.

7.1.2 Das Toxin HipA

Zweck dieses Projektes ist es, den Persistenzzustand in *Salmonella* zu induzieren. Dazu wurden die in *E. coli* entwickelten Systeme nach einem Funktionstest in *E. coli* in den Wildtypsalmonellenstamm SL1344 eingebracht. Dadurch sollte überprüft werden inwieweit eine Toxin-Induktion als Modell für die Salmonellen-Persistenz eingesetzt werden kann.

ERGEBNISSE

Die Identifizierung von *hipA* als Persistergen gelang durch die noch aktive *hipA7* Mutation, die zu einer gegenüber dem Wildtyp 10 bis 100-fach erhöhten Zahl an Persistern führte [136]. HipA ist ein Inhibitor des Zellwachstums und somit das Toxin. Das stromaufwärtsgelegene teilweise überlappende Gen *hipB* kodiert für das instabile Antitoxin. Eine gezielte Überexpression des Toxins HipA führte ebenfalls zu einem erhöhten Auftreten von Persistern [137] [10] [39].

Die für die folgenden Versuche verwendeten Plasmide wurden von N. Vazquez-Laslop (pBAD22*hipA*) [201] und T. Hill (pBAD24*hipA7*) [100] bezogen, beide Plasmide sind arabinoseinduzierbar. Im Wachstumsassay fand bei Erreichen einer definierten Optischen Dichte (OD_{600}) die Induktion der *hipA* Expression durch Zugabe von L-Arabinose statt. Den Kontrollen wurde die gleiche Konzentration an D-Glucose zugeführt. Das Plasmid wurde zuerst in *E. coli* getestet, da dort der Phänotyp von HipA beschrieben wurde.

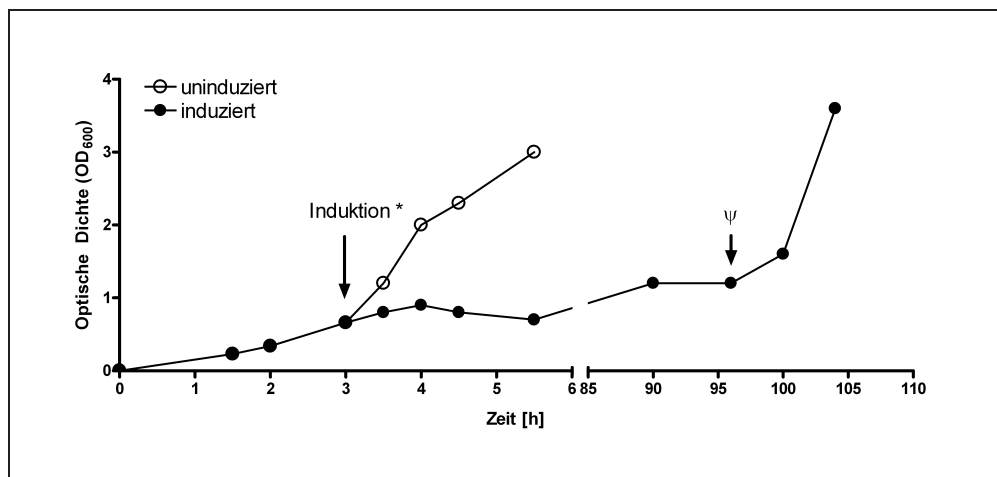


Abbildung 7.2: Wachstumskurve von *pBAD22hipA* in *E. coli* (XL-10) nach Induktion mit L-Arabinose bei einer OD_{600} von ca. 0,5.. Die Induktion führt zur Expression von *hipA* was zum arretieren der Zellen führt. Während die mit Glucose versetzten Kontrollen normal weiter wachsen. ψ Waschen der Zellen mit neuem Medium ohne L-Arabinose.

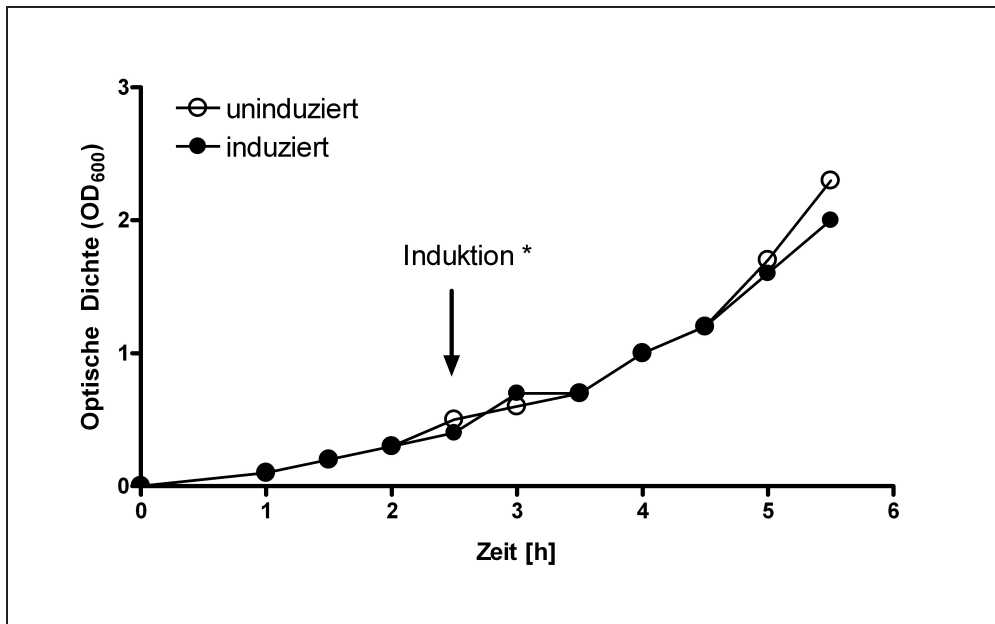


Abbildung 7.3: **Wachstumskurve von pBAD24hipA7 in *E. coli* nach Induktion mit L-Arabinose bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5..** Die Überexpression von *hipA7* zeigt in *E. coli* keine Wirkung auf das Wachstum.

Die Expression von *hipA* führte wie erwartet in *E. coli* zu einem Wachstumsstopp. Dieser Zustand blieb über mehrere Tage konstant. Wurde den Bakterien neues Medium ohne Arabinose gegeben, setzte das Wachstum wieder ein. Das HipA Toxin hatte demnach eine bakteriostatische Funktion auf die Zellen. Es hemmte das Zellwachstum, aber tötete die Bakterien nicht. Dieser Effekt konnte bei einer Expression von *hipA7* nicht beobachtet werden. Die *hipA7*-Gensequenz unterscheidet sich von *hipA* durch zwei Punktmutationen. Beide Mutationen konnten als notwendig in Hinblick auf die Generierung von Persistern beschrieben werden. Durch eine der beiden Mutationen (*hipAG22S*) verliert das Toxin seine toxische Wirkung [101]. Das würde erklären, warum die Überexpression des HipA7 Toxins keinen Effekt zeigte. HipA7 erhöht zwar die Frequenz von Persistern bei Antibiotikagabe, führt alleine aber offenbar nicht zu einem Wachstumsstopp.

Für die Etablierung eines Persistenzmodells in Salmonellen, wurde das pBAD22hipA Plasmid anschließend in SL1344 eingeführt und ein Wachstumsassay unter denselben Bedingungen durchgeführt.

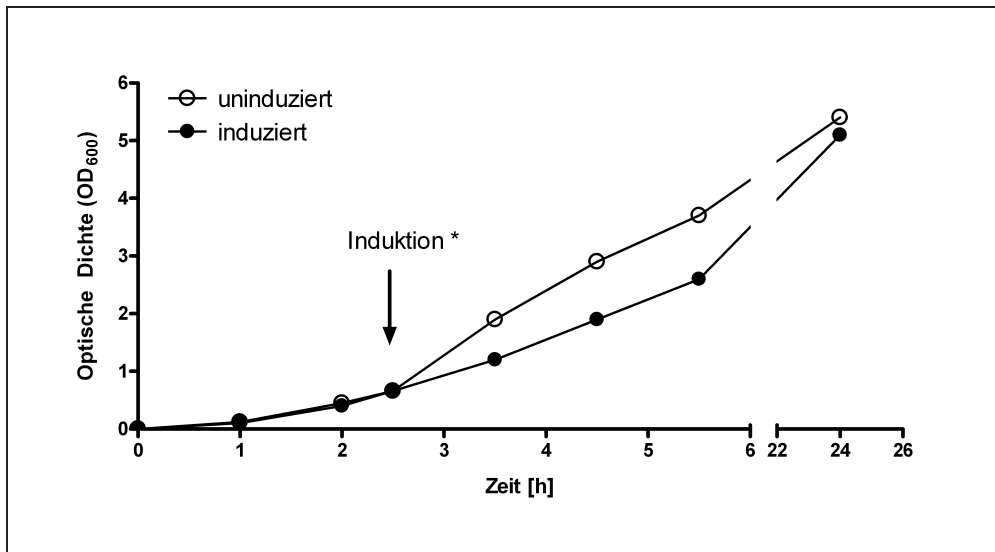


Abbildung 7.4: **Wachstumskurve von pBAD22hipA in SL1344 nach Induktion mit L-Arabinose bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 nach 2,5h.** *hipA* exprimierende SL1344 zeigten gegenüber der Kontrolle ein nur geringfügig verlangsamtes Wachstum.

Die Expression von *hipA* führte in *Salmonella* Typhimurium statt eines Wachstumsstopps nur zu einer leichten Verlangsamung des Wachstums. Das getestete HipA-Konstrukt eignet sich demnach nicht als Persistenzmodell.

7.1.3 Das Toxin RelE

Ebenso wie bei HipBA führt auch die Überexpression des RelBE Toxin/ Antitoxin-Moduls von *E. coli* zu einer 10 bis 10 000-fachen Erhöhung der Persisterzahl. Das Antitoxin RelB liegt chromosomal stromaufwärts von dem Toxin RelE. Als Reaktion auf Nährstoffmangel wird dieses TA-Modul aktiviert und bewirkt einen Stillstand der Wachstumsrate, indem RelE über den Abbau der mRNA direkt die Translation inhibiert.

Mit der Expression von RelE soll ein anderes TA-Modul als Persistenzmodell in *Salmonella* Typhimurium getestet werden. Dazu wurde auch *relE* unter einem arabinoseinduzierbaren Promotor verwendet. Dieses pBAD33*relE* Plasmid stammt von Kenn Gerdes [17].

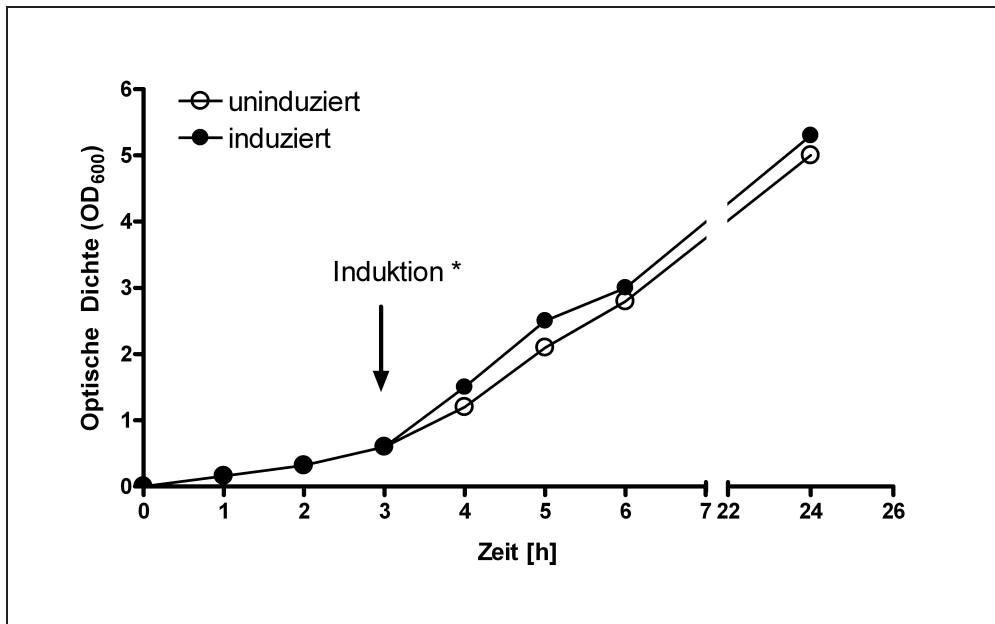


Abbildung 7.5: **Wachstumskurve von pBAD33reIE in SL1344 nach Induktion mit L-Arabinose.** Expression des Toxins RelE hat in SL1344 keinen Einfluss auf das Wachstum.

RelE führte aber in *Salmonella* Typhimurium ebenfalls nicht zu einer Wachstumsblockade. Auch dieses Toxins ist deshalb für dieses Projekt nicht geeignet.

7.2 Überexpression eines Gyrase Inhibitors: SbmC

Wie unter 7.1.2 und 7.1.3 beschrieben, führte die Expression der Toxine RelE und HipA aus *E. coli* in *Salmonella* Typhimurium nicht zu dem gewünschten Wachstumsstopp. Für beide Toxine konnten keine Homologien in *Salmonella* Typhimurium gefunden werden. Vazquez-Laslop et al. konnten zeigen, dass nicht nur TA-Module, sondern auch davon unanhängige Proteine, deren Überexpression eine toxische Wirkung auf die Zelle hat, Persisterzahlen erhöhen können [201]. Zu diesen zählt unter anderem der Gyraseinhibitor.

Die Gyrase ist ein Enzym, das negatives Supercoiling in die DNA einfügt, welches für die Replikation und Transkription notwendig ist. Ein Gyraseinhibitor verhindert somit das Zellwachstum. SbmC ist ein endogener Gyraseinhibitor von *Salmonella* Typhimurium. Die Überexpression des *sbmC*-Gens sollte zum Stillstand des Wachstums führen.

Um diese Hypothese zu testen, wurde das *sbmC*-Gen aus SL1344 in einer PCR amplifiziert und anschließend in das arabinoseinduzierbare Plasmid pBAD18 kloniert. Es folgt

das Wachstumsassay mit pBAD18*sbmC* in SL1344. Die Induktion der *sbmC*-Expression erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,5, nach ca. 3h.

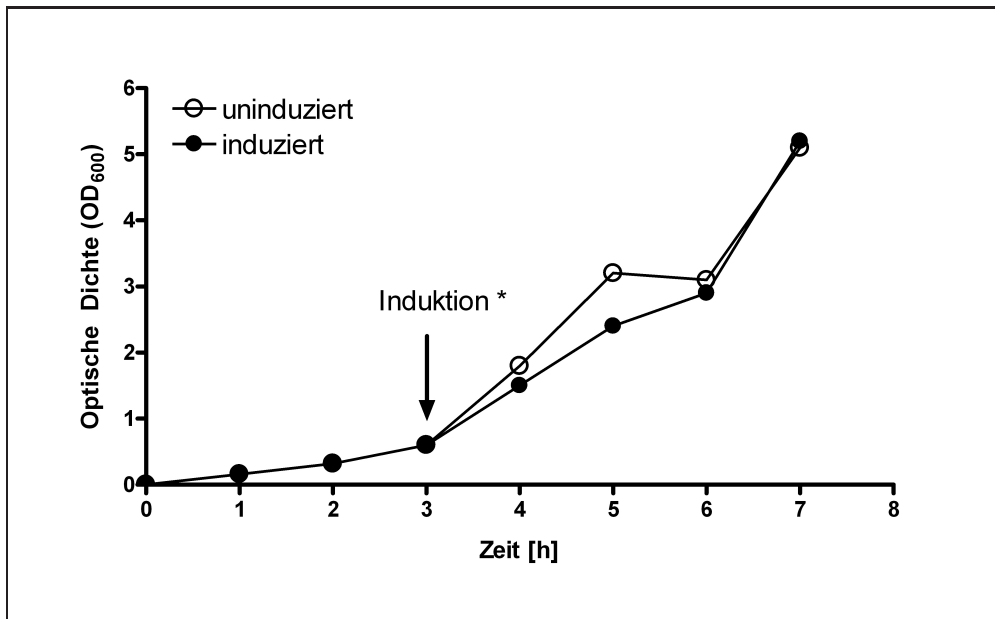


Abbildung 7.6: **Wachstumskurve von pBAD18*sbmC* in SL1344 nach Induktion mit L-Arabinose bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 nach 3h.** Eine Überexpression des Gyraseinhibitors führt in SL1344 nicht zur Wachstumsblockade.

Die Überexpression des Gyraseinhibitors *sbmC* führte ebenfalls zu keinem Wachstumsstopp. Keines der drei getesteten Konstrukte ermöglichte damit den Aufbau eines Persistenzmodells für Salmonellen.

7.3 Persistenzzustand durch Behandlung mit Gentamycin

Eine andere Möglichkeit eine Wachstumsblockade in Bakterien hervorzurufen, ist die Behandlung mit Antibiotika. Dabei dürfen die Zellen jedoch nicht abgetötet, sondern lediglich in ihrer Vermehrung aufgehalten werden.

Das Aminoglykosid Gentamycin wirkt vor allem bei Gram-negativen Bakterien. Es hemmt die Proteinsynthese irreversibel durch Blockieren der Translation an den Ribosomen. Als Folge sind die Zellen nicht mehr in der Lage zu wachsen - die Wirkung von Gentamycin ist demnach bakterizid.

ERGEBNISSE

Um die Wirkung von Gentamycin auf Salmonellen zu testen, wurde SL1344 1:100 in frisches Medium überimpft und nach einer Inkubation von 3h bei 37 °C (OD_{600} von ca. 2,2; ca. 4×10^9 KBE/ml), mit unterschiedlichen Konzentrationen von Gentamycin behandelt. Nach 1h, 2h, 3h sowie über Nacht, wurde durch Ausplattieren die Zahl der noch vermehrungsfähigen Salmonellen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb.7.7 dargestellt.

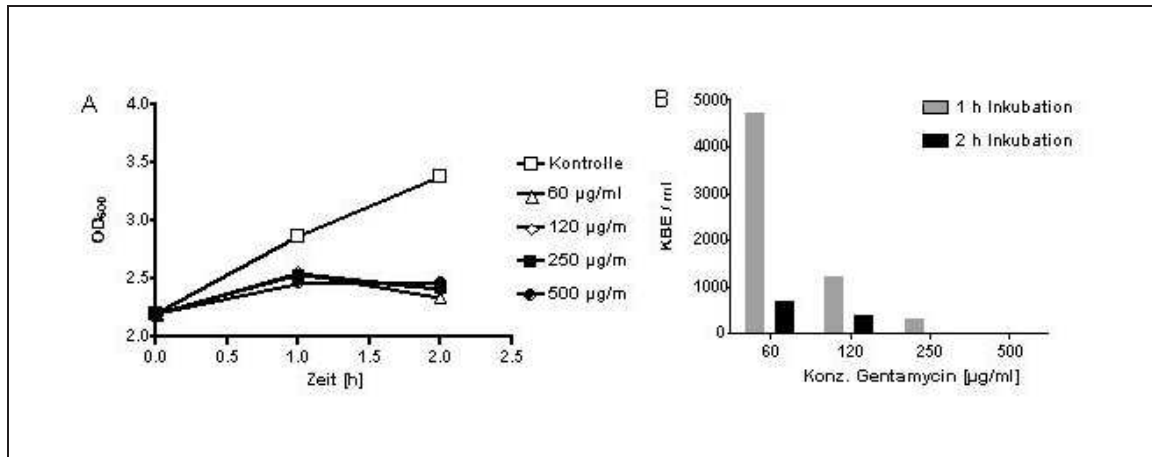


Abbildung 7.7: **Optische Dichte (A) und KBE (B) nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an Gentamycin.** SL1344 wurde 3h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen an Gentamycin (60, 120, 250 bzw. 500 µg/ml) behandelt. Nach 1h und 2h wurde die optische Dichte bestimmt (A) sowie die Zahl teilungsfähiger Zellen über ausplattieren (B). OD_{600} : optische Dichte, KBE: Koloniebildende Einheiten.

Anhand der optischen Dichte (OD_{600}) lässt sich erkennen, dass Gentamycin in allen verwendeten Konzentrationen das Wachstum hemmt. Jedoch sind bei einer niedrigen Konzentration auch nach 2h Inkubation noch zur Replikation fähige Bakterien vorhanden. Erst nach Inkubation mit 500 µg/ml konnte auch schon nach kurzer Inkubationsdauer keine vermehrungsfähigen Salmonellen mehr nachgewiesen werden.

Ziel des nächsten Abschnitts war es, Bakterien mit gehemmter Translation *in vivo* verfolgen zu können. Dafür wird in diesen Zellen ektopisch GFP exprimiert, welches dann mittels FACS gemessen werden kann. Da GFP nur in intakten Zellen nachgewiesen werden kann, dürfen diese nicht lysieren. Der Test erfolgte deshalb mit GFP exprimierenden Salmonellen, deren Wachstum zuvor nach dem oben aufgeführten Protokoll mit Gentamycin gestoppt wurden war.

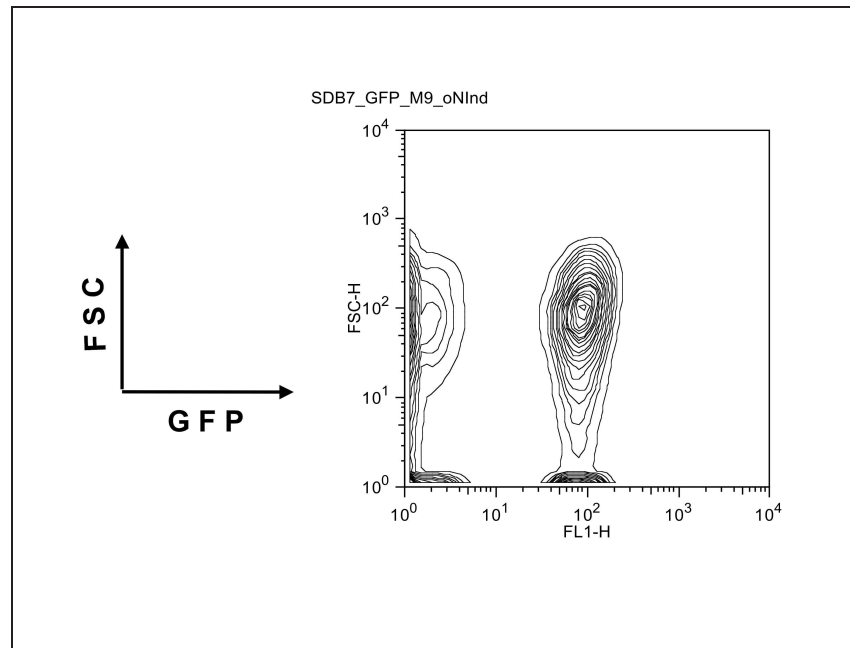


Abbildung 7.8: **FACS-Analyse von SL1344 Δ ssaGH mit pGFP nach Übernachtinkubation mit 500 μ g/ml Gentamycin.** Auch nach Übernachtinkubation mit Gentamycin ist die Hauptpopulation der Zellen lebensfähig, wenn auch nicht mehr reproduktionsfähig.

Dieser Versuch zeigte, dass die Zellen durch die Behandlung mit Gentamycin nicht lysierten. Diese Zellen konnten nun für erste Testversuche *in vivo* verwendet werden. Dabei sollte festgestellt werden, ob Gentamycin-behandelte-GFP-exprimierende Salmonellen aus der Milz isoliert werden können.

Der für die *in vivo* Testversuche verwendete Salmonellenstamm SL1344 Δ ssaGH ist avirulent. Einige dieser avirulenten Salmonellen überleben im Wirt, lösen aber keine Infektion aus.

Der SL1344 Δ ssaGH (pGFP) wurde 2h mit Gentamycin inkubiert und BALB/c Mäusen intravenös verabreicht. An den Tagen 1, 3 und 7 nach der Infektion (p.i.) wurden einige Tiere getötet und die Milz mittels FACS analysiert. Anhand des *Salmonella*-Inokulums, welches für die Infektion verwendet wurde, konnten im FACS die Gates so eingestellt werden, dass sich fluoreszierende Bakterien von autofluoreszierenden Zellen aus der Milz unterscheiden ließen (siehe dazu 7.9).

ERGEBNISSE

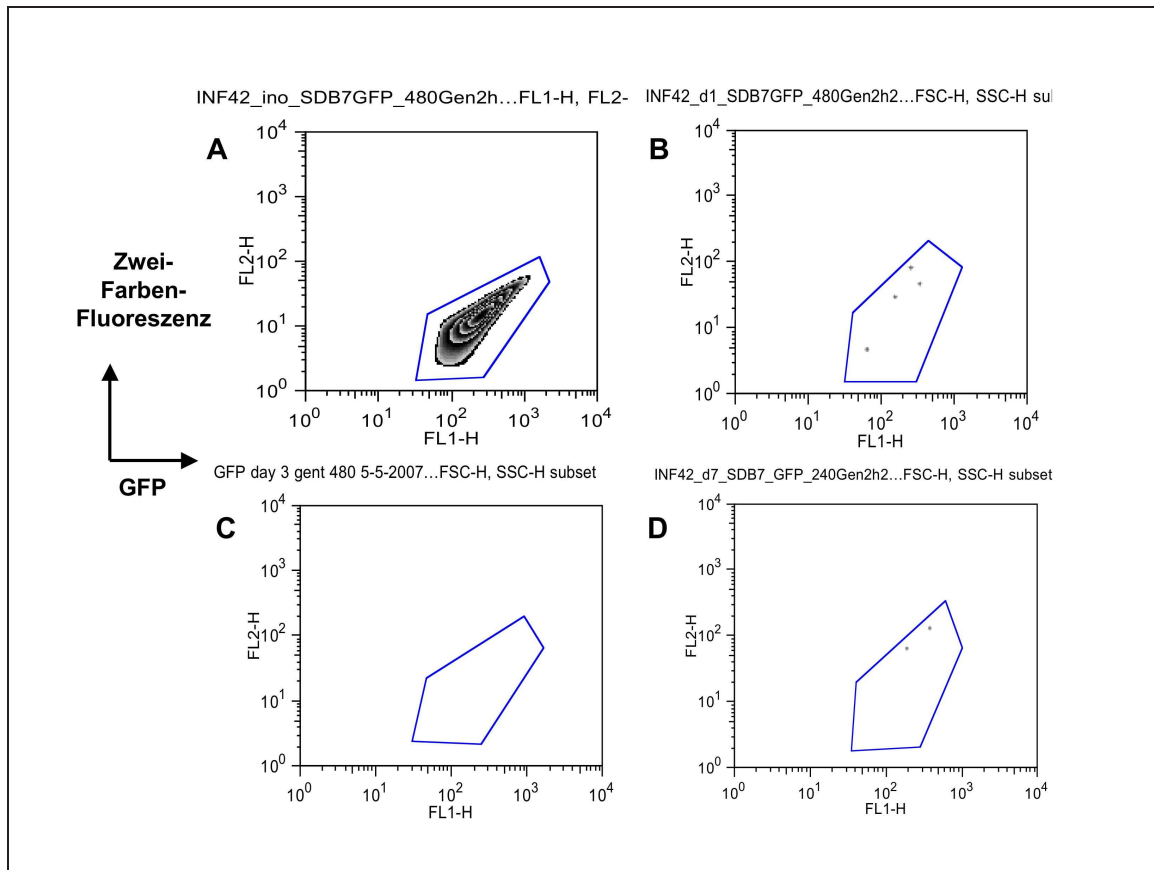


Abbildung 7.9: **Zweifarb-Fluoreszenz um GFP-fluoreszierende Bakterien in der Milz nach i.v.-Infektion zu identifizieren.** Das Inokulum (A) zeigt die für die Infektion verwendeten Bakterien nach 2h Inkubation mit Gentamycin. Daraus konnten die GFP-fluoreszierenden Bakterien eingegrenzt werden (blau markiertes Gate). (B-D) zeigen GFP-Fluoreszenz von isolierten Zellen der Milz nach der Infektion: (B) d1 p.i., (C) d3 p.i., (D) d7 p.i. GFP= green fluorescent protein; p.i. = post Infektion.

Die FACS-Daten lassen erkennen, dass mit Hilfe von GFP Gentamycin-behandelte SL1344 Δ ssaGH auch nach 7 Tagen noch aus der Milz isoliert werden können. Die Zahlen fluoreszierender Zellen sind jedoch sehr klein und erlauben deshalb keine klaren Aussagen, da es sich hier auch um Artefakte handeln könnte. Abgetötete Salmonellen sind offenbar nicht dazu in der Lage *in vivo* zu überleben, es könnte aber auch an anfänglich nötiger Anpassung an die *in vivo*-Verhältnisse liegen. Die spätere Notwendigkeit der Translation bleibt unklar.

7.4 Persistenzmodell mit spezifischen Mutanten von *Salmonella Typhimurium*

Durch zusätzliche Mutationen sollten Gene identifiziert werden, die von den Bakterien während der Persistenzphase und für den Aufbau dieses Zustands essentiell sind, um dadurch neue Angriffziele für Antibiotika gegen chronische Infektionen identifizieren zu können.

Da die ersten Versuche, ein Persistenzmodell durch Überexpression eines für die Zelle toxischen Proteins zu erzeugen, nicht zum Erfolg führten, sollte versucht werden, den Persistenzzustand durch gezielte Mutation zu erreichen. Dabei wurden 2 verschiedene Wege untersucht. Zum einen sollte der Persistenzstatus dadurch erreicht werden, dass die Zellen durch einen Stoffwechseldefekt am Wachstum gehindert sind ($\Delta purA$, Purinbiosynthese [79]) und zum anderen durch das Fehlen von SPI-2 Virulenzfaktoren, welche die intrazelluläre Replikation der Salmonellen in Makrophagen ermöglichen ($\Delta ssaGH$ [130]). Für beide Mutationen ist bekannt, dass sie nach intra venös (i.v.)-Infektion mehrere Wochen im Wirt persistieren können ohne klinische Symptome hervorzurufen [142] [130]. Diese Beobachtungen sollten hier zunächst bestätigt werden.

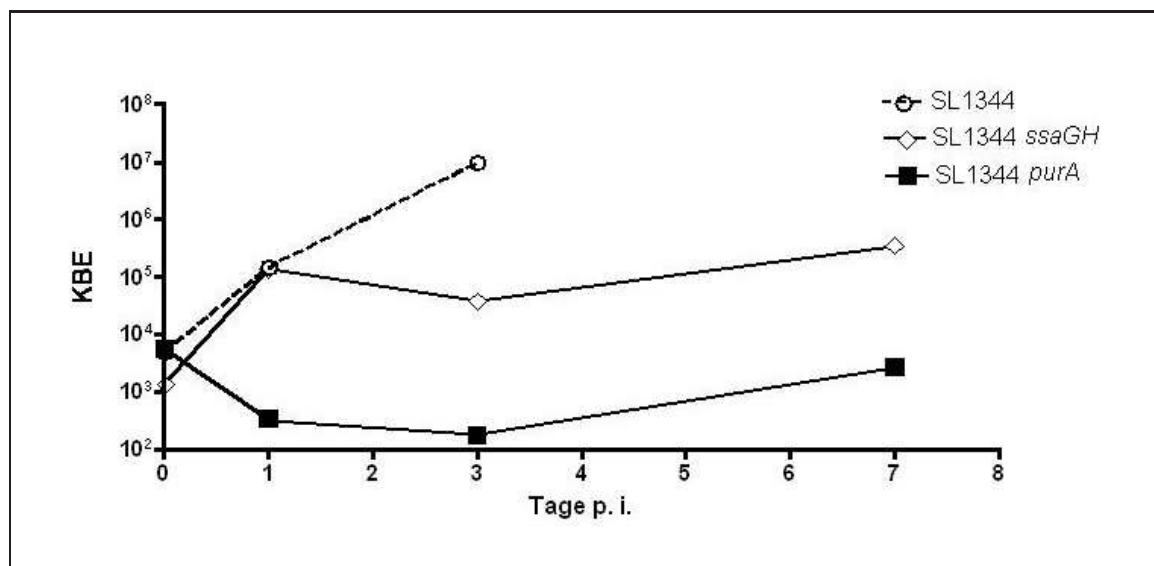


Abbildung 7.10: KBE von SL1344, SL1344 $\Delta ssaGH$ und SL1344 $\Delta purA$ in der Milz an d1, d3 und d7. Mit SL1344 infizierte Mäuse wurden spätestens an Tag 3 getötet, um sichtbare Leiden zu verhindern. p.i.: post Infektion, KBE: Koloniebildende Einheit.

Der *Salmonella Typhimurium* Wildtypstamm SL1344 verzehnfacht seine Anzahl in der Milz jeden Tag. An Tag 3 konnten ca. 10^7 KBE isoliert werden. Der Versuch mit SL1344 wur-

ERGEBNISSE

de an dieser Stelle abgebrochen. Die Mutante mit dem Virulenzdefekt, SL1344 Δ *ssaGH*, zeigte initial eine Erhöhung in der Keimzahl, später fand kaum noch eine Vermehrung statt. Dadurch, dass dieser Stamm noch in der Lage ist, sich mehrmals zu teilen, bevor er persistiert, ist er nicht optimal um molekulare Mechanismen der Persistenz zu untersuchen. Die Stoffwechselmutante SL1344 Δ *purA* war dagegen kaum in der Lage sich in infizierten Mäusen zu vermehren und bestätigt somit schon bekannte Ergebnisse [142] [34].

Im genetischen Hintergrund dieser beiden Salmonellenstämme wurden weitere Mutationen eingefügt, in Genen die während einer akuten Infektion im Typhoid-Fieber-Modell essentiell sind [4]. Zu diesen zählen *asd*, *ubiC* und *ribB* [211] [22] [165]. Des Weiteren wurden *ppk* [155] bzw. *trx* deletiert, da hier frühere Daten eine Bedeutung während der stationären Phase signalisieren [9] [96]. Eine Auflistung der ausgewählten Zielgene ist in der folgenden Tabelle zu sehen.

| Gen | Protein | Bedeutung |
|-------------|---|---|
| <i>asd</i> | Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase | Biosynthese und Degradierung des Mureinsacculus und des Peptidoglycan |
| <i>ribB</i> | 3,4 Dihydroxy-2-Butanon-4-Phosphat-Synthase | Biosynthese von Riboflavin und Kofaktoren: FMN, FAD; Bedeutung z.B. im Citratzyklus |
| <i>ppk</i> | Polyphosphat-Kinase | Proteinabbau bei Aminosäuremangel |
| <i>trx</i> | Thioredoxin 1 | Redox-Faktor, Synthese von Gluthation und Analoga |
| <i>ubiC</i> | Chorismatpyruvat Lyase | Biosynthese von Menaquinon und Ubiquinon |

Tabelle 7.1: Übersicht über die ausgewählten Zielgene und deren Bedeutung für die Zelle.

Die Mutanten Δ *asd* und Δ *ribB* können nur bei Zugabe von DAP (Diaminopimelinsäure) bzw. Riboflavin ins Medium wachsen. Die Δ *ubiC* Mutante zeigte durch den Genverlust stark verlangsamtes Wachstum.

Die Generierung der Mutanten erfolgte über Allel-Austausch der Zielgensequenz gegen eine Kanamycinresistenz-Kassette [24]. In einer PCR-Reaktion wurde die Kanamycin-Kassette mit terminalen 40 bp Anhängen, welche homolog zu den flankierenden Bereichen des Zielgens waren, amplifiziert. Dieses DNA-Fragment wurde anschließend in den Zielstamm per Elektrottransformation eingebracht. Durch homologe Rekombination wurde das Zielgen durch die Kanamycin-Kassette ersetzt. Um diesen Prozess in der Zelle sogar bei nur kurzen Homologiebereichen zu ermöglichen, enthielt der Zielstamm (SL1344 Δ *ssaGH* oder SL1344 Δ *purA*) ein Helfer-Plasmid mit der Lambda-red-Rekombinase (pKD46). Positive Klone konnten in einer PCR-Reaktion mit außerhalb des Zielgens liegenden Primern ermittelt werden. Eine Übersicht über die Mutantenerzeugung nach Datsenko ist in Abbildung 7.11 dargestellt.

ERGEBNISSE

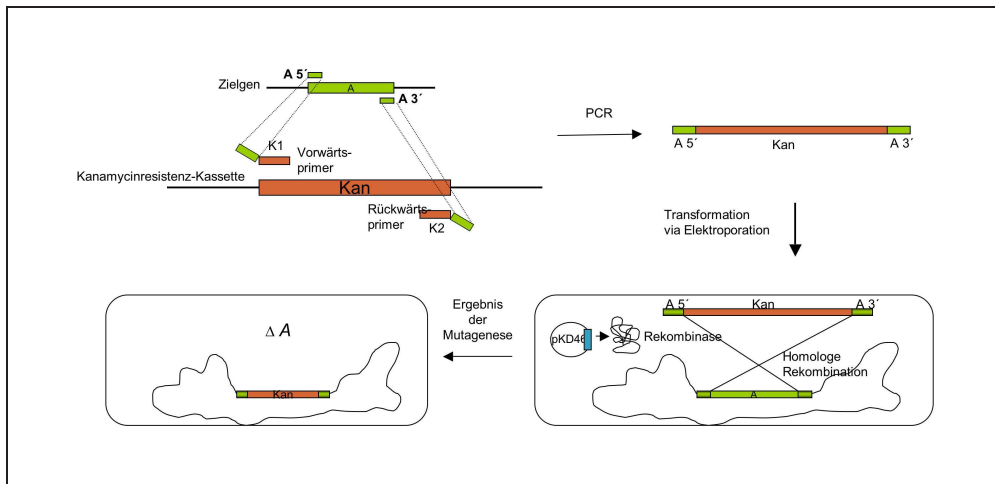


Abbildung 7.11: **Mutagenese in *Salmonella* nach Datsenko.** Bei dieser Methode der Mutagenese wird das Zielgen durch eine Kanamycinresistenz-Kassette (Kan) ausgetauscht. In einer PCR-Reaktion wird die Sequenz der Kan-Kassette vervielfältigt. Die verwendeten Primer enthalten zusätzlich an den Enden jeweils 40 bp der 5' bzw. 3' Sequenz des Zielgens. Das PCR-Produkt wird über Elektroporation in den Zielstamm transformiert. Durch die vom pKD46-Plasmid kodierte Rekombinase wird in der Bakterienzelle die homologe Rekombination zwischen Zielgen und Kan-Kassette gefördert. Kan: Kanamycinresistenz, A: Zielgen.

Ist ein Salmonellenstamm mit einer definierten Mutation generiert wurden (Datsenko- Methode), kann diese sehr einfach mittels eines Bakteriophagen in einen anderen Salmonellenstamm übertragen werden (allgemeine Phagentransduktion). Der P22-Phage ist spezifisch für *Salmonella*. Die P22 HT105/1 int-201-Mutante dieses Phagen erwies sich in der Molekularbiologie als sehr hilfreich [180]. Durch eine Nukleasenmutante, die weniger spezifisch den lysogenen Phagen an den pac-Stellen herausschneidet, hat dieser P22 eine hochtransduzierende Frequenz (HT). Die *int*-Mutation verhindert das stabile Lysogene entstehen.

Für die Mutagenese mittels Phagentransduktion wurde der Donorstamm, der die Kanamycin-Kassette anstelle des Zielgens enthielt, über Nacht mit dem Phagen inkubiert. Nach Herstellung des Phagenlysats wurde eine Übernachtskultur des Rezipienten, welcher die Mutation erhalten sollte, zusammen mit dem Phagenlysat inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend mit EGTA behandelt, um eine Mehrfach-Phageninfektion zu verhindern. Die Selektion auf positive Klone erfolgte über die Resistenz gegenüber Kanamycin, mittels PCR und wenn sinnvoll durch Bestätigung der erwarteten Auxotrophie (Δasd und $\Delta ribB$).

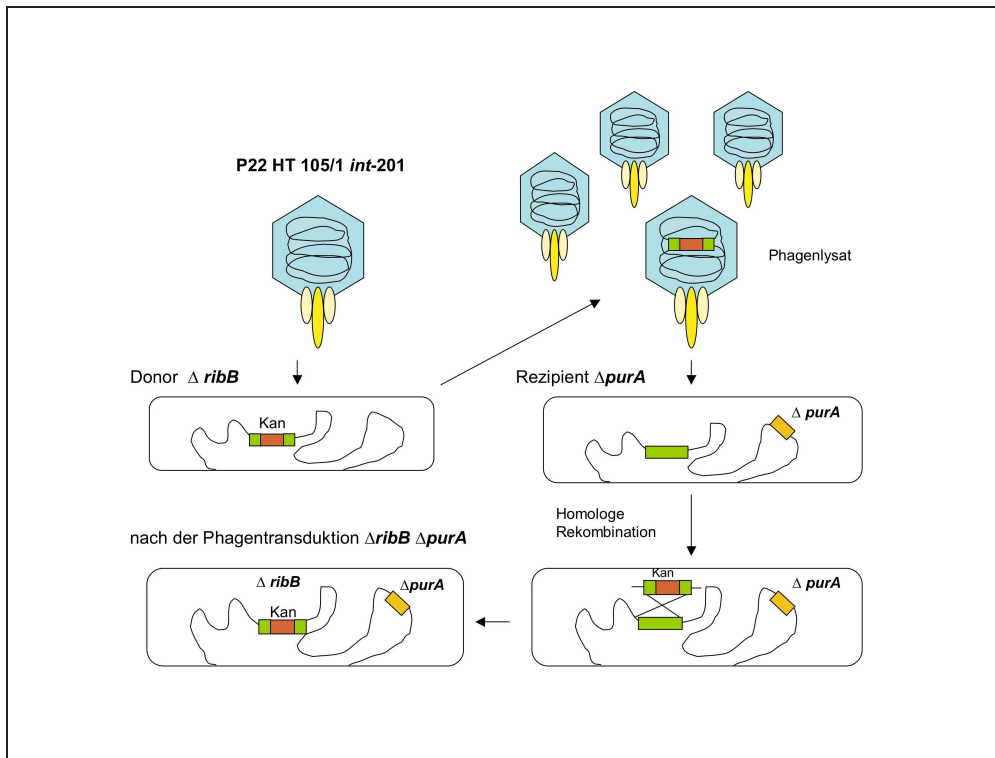


Abbildung 7.12: **Mutagenese über allgemeine Phagentransduktion mittels P22 HAT 105/1 int-201.** Durch den Einbau beliebiger DNA-Fragmente in seine Proteinhülle ermöglicht diese P22-Phagenmutante die Übertragung einer Kanamycinresistenz-Kassette in einem Gen (z.B. $\Delta ribB$) in eine andere Salmonellenmutante (z.B. $\Delta purA$). Dafür wird der Spenderstamm (Donor) mit Phagen infiziert. Die daraus entstehenden neuen Phagen enthalten teilweise auch den Genabschnitt mit der Kan-Kassette. Das Phagenlysats wird anschließend mit dem Rezipienten (Salmonellenstamm mit anderer Mutation) inkubiert. Über homologe Rekombination wird das Zielgen durch die Kan-Kassette ausgetauscht. Die neue Mutante besitzt nun beide Mutationen. Kan: Kanamycinresistenz.

Um Phagenkontaminationen in den Transduktanten auszuschließen, wurden die positiven Klone zweimal auf EBU-Platten ausgestrichen. Über Farbselektion auf diesen grünen Platten konnten die Klone ausgewählt werden, welche keine Phagen mehr enthielten. Während nichtlysogene Bakterien auf diesen Platten hellleuchtende Kolonien bilden, erscheinen mit P22 kontaminierte Salmonellen durch pH-Änderung nach Lyse einiger Bakterien dunkelblau. Eine Übersicht über die Mutantenerzeugung mittels Phagentransduktion zeigt Abbildung 7.12. Enthielt der Rezipient schon eine Kanamycin-Kassette so musste diese zuvor entfernt werden. Dafür wurde das CP20-Helferplasmid in diesen Stamm eingebracht. Dieses kodiert für eine FLP-Rekombinase hinter einem temperatursensitiven Promotor, welche die Kanamycin-Kassette aus dem Genom entfernt [36] [24]. Die Selektion auf positive Klone erfolgte erneut über die Resistenz gegenüber Kanamycin, mittels PCR (siehe 7.11) und wenn sinnvoll durch Bestätigung der erwarteten Auxotrophie (Δasd und $\Delta ribB$).

ERGEBNISSE

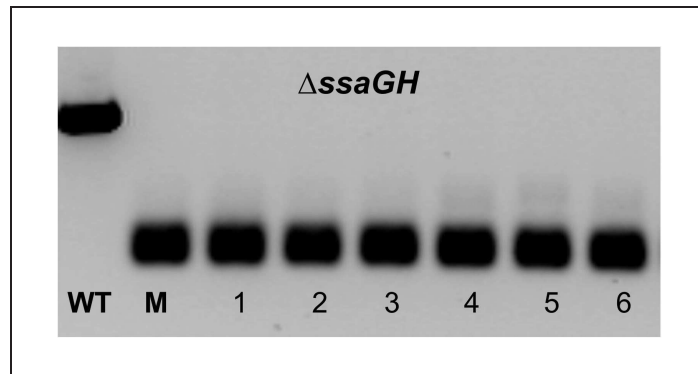


Abbildung 7.13: **Kontroll-PCR für die $\Delta ssaGH$ -Mutation von den Klonen 1-6 nach Phagen-transduktion.** Nach PCR mit *ssaGH* spezifischen Primern weisen alle erhaltenen 6 Klone die Länge des mutierten *ssaGH* auf. Durch entfernen der Kanamycin-Kassette ist das Fragment kleiner als das Wildtypfragment. WT=Wildtypkontrolle. M=Mutantenkontrolle.

Mit Hilfe dieser beiden Methoden zur Mutagenese konnten die gewünschten zusätzlichen Mutationen in den SL1344 $\Delta ssaGH$ und SL1344 $\Delta purA$ eingeführt werden. Die Doppelmutanten wurden für eine *i.v.*-Infektion von BALB/c Weibchen eingesetzt. Die Analyse der Keimzahl in der Milz erfolgte erneut an d1, d3 und d7 nach der Infektion.

Im Folgenden sind die Ergebnisse für die Einzelinfektionen mit den Doppelmutanten im Hintergrund beider Parentalstämme dargestellt, soweit sie bis zum Ende dieser Arbeit generiert und getestet werden konnten. Die *i.v.*-Infektion erfolgte mit 10^6 KBE aus stationärer Phase in 100 μ l 1 x PBS. Die Milz wurde an den Tagen 1, 3 und 7 präpariert, und durch Ausplattieren verschiedener Verdünnungsstufen wurde die Keimzahl bestimmt.

Jede der Mutationen konnte im SL1344 $\Delta ssaGH$ Hintergrund generiert und für die Infektion verwendet werden. Nur die Mutanten $\Delta ribB$, Δasd und Δppk konnten ebenso erfolgreich im SL1344 $\Delta purA$ Hintergrund erzeugt werden. Die Versuche wurden insgesamt 3 mal mit jeweils 2-3 Tieren pro Gruppe durchgeführt (siehe Abbildung 7.14). Die nach der Infektion aus der Milz isolierten Bakterien wurden mittels PCR bezüglich ihrer Identität bestätigt.

ERGEBNISSE

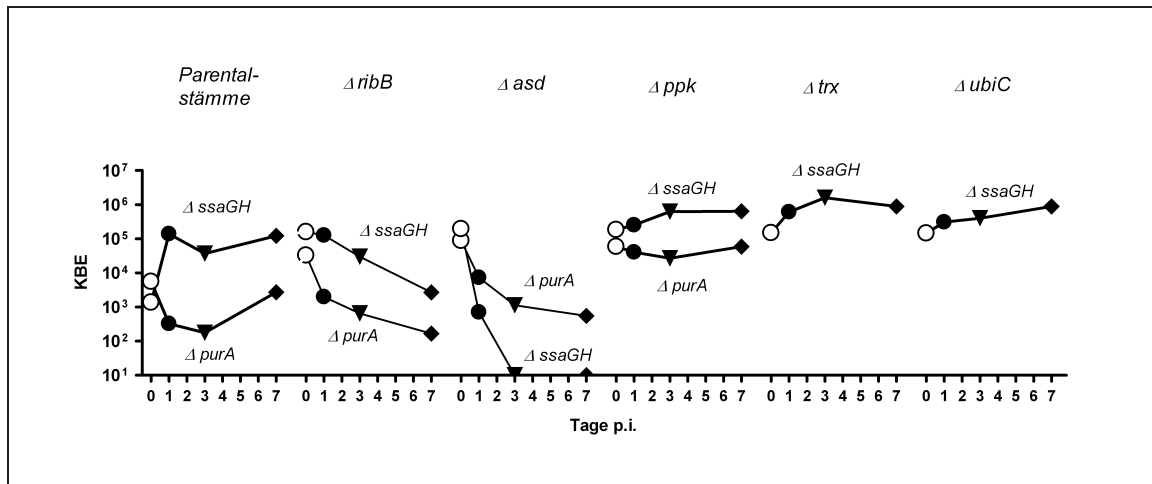


Abbildung 7.14: Übersicht über die Keimzahlen der Parentalstämme und Doppelmutanten in der Milz an d1, d3 und d7 nach der i.v. Infektion. Dargestellt sind die Mutationen $\Delta ribB$, Δasd , Δppk , Δtrx , $\Delta ubiC$ im Hintergrund einer $\Delta ssaGH$ bzw. $\Delta purA$ Mutation. p.i.: post Infektion, KBE: Koloniebildende Einheiten.

Ungefähr ein Zehntel des Inokulums gelangte nach i.v.-Infektion in die Milz (D. Bumann, persl. Mitteilung). Die Doppelmutanten von Δtrx , Δppk und $\Delta ubiC$ zeigten ein vergleichbares Verhalten wie die entsprechenden Einzelmутanten alleine. Zu Beginn eine Erhöhung in der Keimzahl im Fall von $\Delta ssaGH$ mit anschließender Stabilisierung und im Fall von $\Delta purA$ ein initiales Absinken der Keimzahl. Diese betroffenen Gene scheinen demnach keine essentielle Rolle in der Etablierung des Persistenzzustands zu spielen. Dagegen zeigten die Mutationen von $ribB$ und asd , dass die entsprechenden Genprodukte für diesen Prozess von Bedeutung sind. In beiden Fällen waren die Doppelmutanten nicht dazu in der Lage, eine konstante Zahl an Zellen in der Milz aufrechtzuerhalten. Die Δasd -Mutation wirkt sich im $\Delta ssaGH$ Hintergrund besonders drastisch aus. Durch den zusätzlichen Verlust des asd -Gens ist dieser Stamm nicht in der Lage eine neue Zellwand auszubilden, als Folge lysieren die Bakterien bei der Teilung. An Tag 1 konnten noch ein paar wenige KBE isoliert werden, jedoch nicht zu späteren Zeitpunkten. Ein Grund dafür könnte die initiale Vermehrung von $\Delta ssaGH$ sein.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Doppelmutanten sind makroskopisch erkennbar, deshalb wurden die an Tag 7 präparierten Milzen fotografiert, und sind in Abbildung 7.15 dargestellt.

ERGEBNISSE

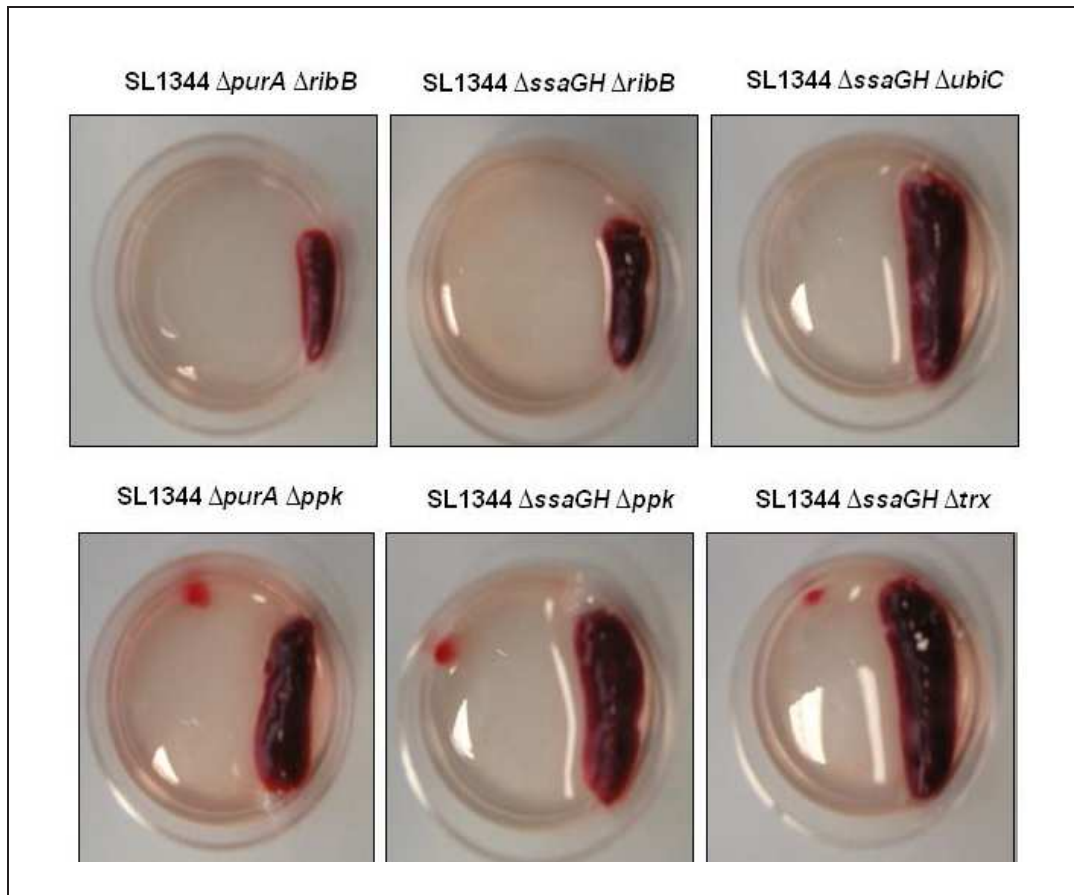


Abbildung 7.15: **Milzen an Tag 7 nach i.v. Infektion mit den verschiedenen Doppelmutanten.** Die Größe der Milz zeigte eine Übereinstimmung mit der Zahl an KBE in der Milz an Tag 7 nach der Infektion.

Die Ergebnisse der KBE-Zahlen an Tag 7 p.i. waren auch makroskopisch an der Größe der Milz zu erkennen. Die Mutanten, bei denen an Tag 7 zwischen 10^5 und 10^7 KBE aus der Milz isoliert werden konnten, zeigten auch eine starke Vergrößerung der Milz, vor allem die $\Delta ssaGH \Delta trx$ Mutante. An Tag 7 nach Infektion mit den beiden $\Delta ribB$ Doppelmutanten, deren Zahl nach der Infektion stetig abnahm, hatte die Milz ihre normale Größe.

Mit Hilfe der beiden Mutationen $\Delta ssaGH$ und $\Delta purA$ konnten zwei Persistenzmodelle etabliert werden. Da beide Stämme nicht völlig inaktiv sind, sondern sich noch (langsam) vermehren, sind sie als Modell für Dormanz jedoch nicht optimal. Um das Modell zu optimieren, wäre eine Kombination der Mutationen $ssaGH$ bzw. $\Delta purA$ und die Überexpression eines toxischen Proteins möglicherweise sinnvoll.

Durch Einfügen von zusätzlichen Mutationen konnten einige Faktoren auf ihre Rolle während der Persistenz untersucht werden. Während der Verlust von ppk , trx und $ubiC$ auf die Persistenz keinen wesentlichen Einfluss hat, scheinen die Gene $ribB$ und asd für die Zelle

essentiell zu sein.

Nur $\Delta ribB$ und Δasd zeigten eine beeinträchtigte Persistenz. Da es jedoch bei beiden Mutanten über einen Zeitraum von einer Woche nur zu einer Abnahme um das ca. 10 - 100fache kam, sind diese Ziele für eine Antibiotika-Therapie bei persistierenden Infektionen offenbar nur bedingt geeignet. Überraschend ist, dass Gene, welche bei der akuten Infektion essentiell sind (keine KBE der Mutanten *in vivo* nach 4 Tagen) nur geringen (*asd*, *ribB*) oder gar keinen Effekt (*ubiC*) während der Persistenz haben. Dies zeigt, wie schwer es ist, eine geeignete Antibiotika-Therapie zu entwickeln.

8. Diskussion

Persistierende Pathogene stellen ein großes gesundheitliches Problem dar. Nach einer akuten Infektion können einige der pathogenen Erreger innerhalb der Wirtsorgane überdauern, sogar in Gegenwart einer Immunreaktion des Wirtes. Durch kontinuierliche Abgabe dieser Krankheitserreger z.B. in Urin oder Stuhl stellen die chronisch infizierten Wirtsorganismen ein bedeutendes Reservoir dar. Für Pathogene mit einem sehr begrenzten Wirtsspektrum wie *Salmonella Typhi* ist dieses Merkmal für eine erfolgreiche Transmission von entscheidender Bedeutung. Persistierende Bakterien liegen vermutlich in einem dormanten Zustand vor, der eine Behandlung mit herkömmlichen Antibiotika erschwert, da diese zumeist nur aktive Prozesse in der Bakterienzelle angreifen. Persister sind dabei keine Mutanten und auch nicht unbedingt resistent gegenüber den Antibiotika, sondern eher phänotypische Varianten des Wildtyps, die sich in einem dormanten Zustand mit geringem Level an Proteinsynthese befinden. Um auch diese Bakterien-Subpopulation zu vernichten und somit eine Infektion schnell und vollständig zu bekämpfen, ist ein umfassendes Verständnis der Interaktion zwischen Wirt und Pathogen erforderlich.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte deshalb der Persistenzzustand in *Salmonella Typhimurium*, dem Erreger einer Typhus-ähnlichen Erkrankung in der Maus, induziert werden, um dann durch Mutationen in wichtigen Lebensprozessen der Bakterien essentielle Faktoren des Persistenzzustands zu identifizieren, die effektive Ziele für neue Antibiotika darstellen können.

Innerhalb einer Bakterienpopulation existiert eine Subpopulation, welche sich in einem Zustand der Stasis befindet. Diese sich nicht vermehrende Subpopulation kommt jedoch nicht nur in Pathogenen vor, da der Zustand auch anderen Bakterien dazu dient, sich an ungünstige Umweltbedingungen anpassen zu können [109]. Möglicherweise sind Persister wichtige „altruistische“ Zellen, die ihr Wachstum eingestellt haben, um das Überleben der Population bei kritischen Lebensbedingungen zu sichern [114] [53]. Vor allem in Biofilmen sind Persister dafür verantwortlich, dass diese zumeist multitolerant gegenüber Antibiotika sind. Sollte die Hauptpopulation einer Bakterienkolonie zum Beispiel durch Antibiotika abgetötet werden, überleben die Persister und durch deren Reaktivierung bilden sie eine neue Population aus, welche erneut eine Infektion auslösen kann. Anders als resistente Mikroor-

ganismen sind diese jedoch noch immer prinzipiell sensitiv gegenüber den Antibiotika. Das intrazelluläre Pathogen *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) ist ein wichtiges Beispiel dafür. Die Antibiotikabehandlung gegen eine Mtb Infektion erstreckt sich über mehrere Monate, um auch die Persister zu erreichen. Trotzdem überlebt immer noch ein kleiner Anteil eine solche Behandlung. Durch die lange Therapiezeit wird auch die Möglichkeit erhöht, dass sich Resistenzen gegenüber den verwendeten Antibiotika ausbilden können. Ein großer Nachteil ist auch, dass viele Patienten die Therapie vorzeitig abbrechen und dann einen Rückfall erleiden können. Eine Verringerung der Behandlungszeit durch Antibiotika, die direkt auf dormante Bakterien zielen, könnte diese Probleme lösen.

Um neue Targets für Antibiotika zu finden, müssen Schlüsselprozesse für das Überleben dieser Persister identifiziert werden. Dafür muss zuerst einmal der Persistenzzustand in *Salmonella* Typhimurium induziert werden, um anschließend mit Hilfe von Mutationen für die Persistenz notwendige Prozesse zu identifizieren. Expressionsmuster von Persistern zeigten eine starke Erhöhung in der Aktivität von Toxin/Antitoxin-Modulen (TA-Module), wohingegen die Expression von wichtigen Enzymen für den Energiestoffwechsel sowie Flagellensynthese und Chemotaxis herunterreguliert waren [182]. Die Toxine dieser TA-Module, welche essentielle Lebensprozesse der Bakterienzelle inhibieren, können über 2 Wege reguliert werden. Zum einen über antisense-RNA und zum anderen über Antitoxin-Proteine. Letztere sind die oben erwähnten Toxin/ Antitoxin-Module, bei denen zumeist das instabile Antitoxin mit dem stabilen Toxin einen inaktiven Proteinkomplex bildet. Während für *E. coli* 11 solcher TA-Module bekannt sind, besitzt *Mycobacterium tuberculosis* sogar 38 chromosomale TA-Module. Sie modulieren die globalen Level an Translation und Replikation während Nährstoffknappheit. Bei Aminosäuren- und Kohlenstoffquellenmangel regulieren die freilebenden Bakterien ihre Synthese stabiler RNAs (rRNA und tRNA) und somit ihren Metabolismus herunter. Ausgehend von diesen Daten sollte hier getestet werden, ob mit solchen TA-Modulen direkt ein Persistenz-Zustand in Salmonellen induziert werden kann. Da für *Salmonella* Typhimurium bis zum jetzigen Zeitpunkt keine derartigen TA-Module bekannt sind, sollten zuerst zwei wichtige Toxine von *E. coli*, HipA (aus HipBA) und RelE (aus RelBE), in diesem Stamm getestet werden.

Ein in *E. coli* wirksames *hipA*-Konstrukt wurde dafür in den Zielsalmonellenstamm eingebracht und getestet. Hier konnte jedoch keine Wachstumshemmung erzielt werden, ebenso erfolglos waren entsprechende Versuche mit dem zweiten Toxin RelE. Möglicherweise sind in *Salmonella* die Zielsequenzen der beiden Enzyme nicht vorhanden, so dass sie hier keinerlei Wirkung entfalten können. Bei HipA handelt es sich um eine Serinkinase. Auf welche Art und Weise sie das Zellwachstum in *E. coli* hemmt, ist jedoch noch nicht klar [21].

Neben einer Expression von Toxinen kann die Überexpression bestimmter Enzyme einen Wachstumstopp zur Folge haben, wie z.B. Chaperone oder Gyraseinhibitoren [201]. Um

DISKUSSION

diese Hypothese zu testen, wurde *sbmC* ausgewählt, ein Gen welches für einen Gyraseinhibitor von *Salmonella* Typhimurium kodiert. Wie schon für die beiden Toxine wurde auch hier eine L-Arabinose induzierbare Expressionskassette verwendet. Aber auch im Fall einer Überexpression von SbmC konnte kein Wachstumsstopp detektiert werden.

Alternativ sollte die gewünschte Wachstumsinhibierung mit Hilfe eines Antibiotikums erreicht werden, ohne aber zu einer Lyse der Zellen zu führen. Das Aminoglykosid Gentamycin hemmt irreversibel die Translation, so dass die Bakterien nicht in der Lage sind neue Proteine zu synthetisieren und zu wachsen.

Nach *in vivo* Verabreichung solcher Gentamycin-behandelten mit GFP-markierten Salmonellen an BALB/c-Mäusen kam es allerdings innerhalb von einem Tag zu einer schnellen Zerstörung, so dass keine Persistenz beobachtet werden konnte. Entweder sind andauernde Salmonellen-Aktivitäten zur Aufrechterhaltung der Persistenz nötig, oder es kommt lediglich auf eine initiale Anpassung der Salmonellen an die Wirtsumgebung an, die in Gentamycin-behandelten Salmonellen nicht stattfinden kann.

Schließlich wurde ein bekanntes Persistenz-Modell durch spezifische Deletionen im *Salmonella* Typhimurium Genom verwendet. Bekannt war, dass das Fehlen von *ssaGH* und *purA*, zwei Genen deren Proteine in vollkommen unterschiedlichen Prozessen von Bedeutung sind, zu einem weitgehendem Wachstumsstopp der Mutanten führt. Die *ssaGH* Mutante mit Defekt in der Regulierung der SPI-2 Genexpression zeigte nach der Infektion initial eine mit dem Wildtypstamm vergleichbare Zunahme der Kolonienzahl, um sich dann ab Tag 1 nur noch gering zu vermehren. Sie konnte auch noch nach 7 Tagen aus der Milz isoliert werden. Durch den Verlust des *purA* Gens dagegen, wodurch die Zellen keine Purine für DNA oder RNA Synthese mehr produzieren konnten, starben sie initial ab. Anschließend jedoch nahm ihre Zahl langsam wieder zu, so dass auch diese Mutante noch nach einer Woche aus der Milz isoliert werden konnte. Verglichen mit der *ssaGH* Mutante war deren Zahl jedoch um ein vielfaches geringer. Die anfänglichen Teilungen zeigen, dass diese Mutanten nicht vollkommen inaktiv sind und als Persistenzmodell aus diesem Grund auch noch nicht optimal sind. Ein ideales Modell würde keine initialen Teilungsraten mehr aufweisen. Um das in der Zukunft zu erreichen, könnten die beiden Mutationen der einzelnen Parentalstämme untereinander oder mit der Überexpression eines für die Bakterienzelle toxischen Proteins kombiniert werden. Jedoch sind beide Stämme in der Lage, in der Milz der Maus für den Zeitraum von mindestens einer Woche zu persistieren und wurden deshalb für erste Experimente eingesetzt.

Um wichtige Gene zu identifizieren, welche die Zelle braucht, um in diesem Zustand zu überleben, wurden zusätzliche Mutationen eingefügt.

DISKUSSION

Becker et al. demonstrierten mit Proteomics und *in vivo* Analysen die Wichtigkeit folgender Gene während einer akuten Infektion im Typhoid-Fieber-Modell: *asd* (Semialdehyd-Dehydrogenase), *ubiC* (Chorismat-Pyruvat-Lyase) und *ribB* (Phosphat-Synthase) (siehe Abschnitt 7.4) [4]. Diese Gene wurden deshalb als Zielgene für dieses Projekt ausgewählt. Von den drei Mutationen zeigte *ubiC* ein mit dem *ssaGH* Parentalstamm vergleichbares Verhalten, so dass die darüber kodierte Chorismat-Pyruvat-Lyase in der Ubichinon-Biosynthese demnach keine essentielle Funktion innerhalb der ersten 7 Tage der Persistenz hat. Die von *asd* und *ribB* kodierten Proteine dagegen verdeutlichten eine essentielle Rolle für die Salmonellen-Persistenz im Wirt. Die beim Aufbau der Zellwand beteiligte Semialdehyd-Dehydrogenase ist vor allem zu Beginn der Infektion notwendig, da sie für die Segregation der Zellen, bevor sie in den Ruhezustand übergehen, unerlässlich ist. Die Infektionen mit den Parentalstämmen alleine zeigten, dass sich die *ssaGH*-Mutante initial vermehrt, während die Zahl der *purA* Mutanten in der Milz zu Beginn abnahm, jedoch anschließend wieder anstieg. Die wenigen Teilungsvorgänge die der *ssaGH*-Stamm noch vollzieht, sind ausreichend das die *ssaGH asd* Mutante nicht im Wirt kolonisieren und demnach auch nicht mehr nach 7 Tagen aus der Milz isoliert werden kann. Im *purA* Hintergrund zeigt die *asd* Mutation initial einen ähnlichen absteigenden Infektionsverlauf wie der Parentalstamm allein, im Gegensatz zu diesem ist er jedoch nicht in der Lage seine Zahl wieder zu erhöhen, überdauert aber in signifikanten Mengen. Ähnliche Ergebnisse ließen sich auch bei der *ribB* Mutation in beiden Parentalstämmen beobachten. Sowohl Zellwandsynthese als auch Riboflavin-Stoffwechsel sind demnach für Salmonellen-Persistenz wesentlich. Andererseits zeigt die niedrige, aber dauerhafte Besiedlung von Mausorganen durch diese Mutanten, dass die entsprechenden Enzyme keine geeigneten Zielmoleküle für eine rasche antimikrobielle Chemotherapie von Persistern darstellen.

Für zwei weitere Gene deren Bedeutung in der stationären Phase liegen, *ppk* (Polyphosphat-Kinase) und *trxA* (Thioredoxin 1; Redox-Faktor), konnte keine Rolle in der Aufrechterhaltung des dormanten Zustands der Zelle dargelegt werden, denn beide zeigten eine mit dem Parentalstamm vergleichbare Kolonisierung der Milz.

Die Ergebnisse zeigen, dass es schwierig sein könnte eine geeignete Antibiotika-Therapie gegen Persister zu entwickeln, da selbst Gene die bei einer akuten Infektion essentiell sind, nur geringen (*asd*, *ribB*) oder gar keinen Einfluss (*ubiC*) auf die Persistenzausbildung hatten und auch Mutationen in anderen für die Zelle bei Kolonisierung und Überleben in Wirtszellen wichtigen Genen wie *trxA* und *ppk* keinen Effekt zeigten.

Weitere Untersuchungen könnten die Rolle von weiteren zentralen Aspekten der Salmonellen-Biologie für die Persistenz in infizierten Wirtsgeweben klären und die Eignung entsprechender Zielenzyme für eine antimikrobielle Therapie bestimmen.

9. Material

9.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden in p.A. Qualität von Roth, Sigma, Fluka, Merck, BD und Gibco bezogen. Enzyme stammten von Fermentas, New England Biolabs, Invitrogen und Promega.

9.2 Nährmedien, Medienzusätzen und Antibiotika

LB-Medium:

- LB-Medium (Lennox) für die Mikrobiologie (Roth) 20g
- 1l destilliertes H₂O

LB-Agar:

- 20 g LB-Medium
- 20 g Agar
- 1l destilliertes H₂O

EBU-Agar:

- 20 g LB-Medium
- 20 g Agar
- mit 960 ml dH₂O auffüllen, nach dem autoklavieren Zugabe von:
- 1250 µl 1% Evans-Blue-Lösung
- 2,5 ml 1% Fluorescein-Lösung

MATERIAL

- 40 ml 12,5% K_2HPO_4 -Lösung
- 12,5 ml 20% Glucose-Lösung
- Antibiotika und Zusätze wie benötigt

SOC-Medium:

- 20 g Bacto-Trypton
- 5 g Bacto-Hefeextrakt
- 0,5 g NaCl
- 10 ml 250mM KCl
- pH 7,0 einstellen (mit NaOH); nach autoklavieren Zugabe von:
- 10 ml 1M $MgCl_2$
- 10 ml 1M $MgSO_4$
- 20 ml 1M Glucose

M9-Minimal-Medium:

- 20 ml 5x M9 Salz
- 2 ml 20% Glucose-Lösung
- 100 μ l 100mM $MgSO_4 \times 7 H_2O$
- 1 ml 0,4% Histidin
- 77 ml H_2O
- pH 6,0 bzw. pH5,8 einstellen; sterilfiltrieren

5x M9 Salz:

- 12,8 g $Na_2HPO_4 \times 7 dH_2O$
- 3 g KH_2PO_4
- 0,5 g NaCl
- 1 g NH_4Cl
- pH 6.0 einstellen; sterilfiltrieren

MATERIAL

| Antibiotika/Zusätze | Stammlösung | Arbeitskonz. | Hersteller |
|----------------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------|
| Streptomycin | 90 mg/ml in H ₂ O | 90 µg/ml | Sigma (S6501) |
| Ampicillin | 100 mg/ml in H ₂ O | 100 µg/ml | Roth (K029.2) |
| Kanamycin | 50 mg/ml in H ₂ O | 50 µg/ml | Roth (T832.3) |
| Chloramphenicol | 20 mg/ml in 70% | 20 µg/ml | Roth (3886.1) |
| Gentamycin | 50 mg/ml | 500 µg/ml | Gibco |
| Diaminopimelinsäure | 25 mg/ml | 50 µg/ml | Sigma (D1377-104) |

9.3 Puffer

PBS (10x), pH 7,4

- 2 g KCl
- 80 g NaCl
- 2,4 g KH₂PO₄
- 14,4 g NaH₂PO₄

TBE (10x), pH 8,3

- 108 g Tris
- 40 ml EDTA (0,5M)
- 54 g Borsäure

9.4 Kits

Isolierung genomischer DNA

NucleoSpin®, Plasmid Quick Pure [Machery-Nagel; 740615.250]

- starkes vortexen bei Schritt 2 und 3

Plasmidpräparation

Wizard Plus SV MiniPreps [Promega]

Plasmid dna-OLS [OLS Omni Life Science]

PCR-Aufreinigung und Gelextraktion

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System [Promega]

RNA-Isolierung und Aufreinigung

RNeasy Plus Mini Kit [Qiagen]

9.5 Laborausstattung

Die Laborausstattung stammte von Becton Dickinson, Eppendorf, Greiner und Sarstedt, wenn nicht anders angegeben.

9.6 Oligos

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech bezogen.

| Bezeichnung | 5->3 Sequenz | Bemerkung |
|---------------|---|-----------------------|
| <u>Teil 1</u> | | |
| phoP P1 | AACGCTAGACTGTTCTTATT GTTAACACAAGGGAGAAGAGG TG TAGGCTGGAGCTGCTTC | mit Kanamycin-Sequenz |
| phoP P2 | CGCAGCGACAGCGGCAGA AAATGGCGAGCAAATTTATTCA ATTCCGGGGATCCGTCGACC | |
| phoP P3 | ATCCCCAAAGCACCATAATC | mit Kanamycin-Sequenz |
| phoP P4 | TCGCCAGCAAAAAACGAACC | |
| sipB P1 | TCTGGAGGCGCTAAAAACGG | |
| sipB P2 | GGCGGGATTATTCCACAC | |
| ssrB P3 | ATGATCTTCAAAAACACTAC | |
| ssrB P4 | TGCGTGCGTAAGGCTCA | |
| <u>Teil 2</u> | | |
| asd fwd | GCAGATTACCGTTCGCATCA | |
| asd rev | GGCGAAGCGTTAACCGGTAT | |
| purA fwd | GCTGTATATCTGAAAAAGCG | |
| purA rev | ACACAGCAATGTATCACACT | |

MATERIAL

| | | |
|------------------|------------------------|-----------------------|
| ribB fwd | GTGTTCCGGCTTACGTCGTC | |
| ribB rev | CGGCATTGACTCATGAACCT | |
| ssaGH fwd | TTCTAAATTTTGCTATGTTG | |
| ssaGH rev | CTGCAGAGGACTTTACATAA | |
| ubiC fwd | CCCCCGTAATGTCTTTTCT | |
| ubiC rev | AAACGGTGAAACGCCAGCAG | |
| trxA P1 | GCTACACCAACACGCCAGGC | |
| | TTATTCCTGTGGAGTTATATGT | |
| | GTAGGCTGGAGCTGCTTC | mit Kanamycin-Sequenz |
| trxA P2 | CCAGCTGCCTAGGGGCCTT | |
| | ATGGAAAATATGCAGCTTACT | |
| | GTTTCCGCGACATACCACT | mit Kanamycin-Sequenz |
| trxA fwd | GCTGGTTCACCTTGCGA | |
| trxA rev | GACAACAGACGCCACGA | |
| ppk P1 | TCAGGCAGTGTCCCGTGAAT | |
| | AAAACGGAGTATAGGTAGTAGT | |
| | GTAGGCTGGAGCTGCTTC | mit Kanamycin-Sequenz |
| ppk P2 | CCAGCTGCCTAGGGGCCT | |
| | TAGCGATACGGTTAAATGCTA | |
| | TTAGGGGAGCAGGCGTCCTC | mit Kanamycin-Sequenz |
| ppk fwd | ACAGCACTGCGTCTGCTTGC | |
| ppk rev | ATCTGCATTGCGCCGTCAAC | |
| sbmC fwd XbaI | GCGGTCTAGATTTAAGAAG | |
| | GAGATATACATATGGAT | |
| SbmC rev HindIII | GCGGAAGCTTTCACTT | |
| | CCGCTGTACCGGAA | |

9.7 Bakterienstämme

Im nachfolgenden sind alle Bakterienstämme, die für die Infektionsversuche bzw. Klonierungsversuche verwendet wurden, unterteilt in die beiden Titelthemen.

MATERIAL

Bakterienstämme, die für Teil 1 benötigt wurden:

| Bakt.Stamm | Genotyp | Resistenz/Zusatz | Quelle |
|-------------------------------|------------------------------|------------------|-----------------------------------|
| <u>Salmonella Typhimurium</u> | | | |
| SL1344 | Xyl, hisG, rspL | S | Hoiseth, S.K.; Stocker, B.A.D. |
| SDB14 | SL1344 <i>aroA</i> | S, K | Bumann, D. |
| SDB15 | SL1344 <i>aroA</i> | S | Bumann, D. |
| SDB18 | SL1344 <i>aroA asd</i> | S, K, DAP | Bumann, D. |
| SDB19 | SL1344 <i>aroA asd</i> | S, DAP | Bumann, D. |
| SDB38 | SL1344 <i>aroA sipB</i> | S, K | Bumann, D. |
| SDB48 | SL1344 <i>ssrB invG</i> | S, K, Cam | Bumann, D. |
| SDB54 | SL1344 <i>ssrB invG phoP</i> | S, Cam, K | Bumann, D. |
| SDB72 | SL1344 <i>aroA asd flhD</i> | S, K, DAP | Bumann, D. |
| SDB74 | SL1344 <i>aroA invG</i> | S, Cam, DAP | Bumann, D. |
| SMR19 | SL1344 <i>aroA asd phoP</i> | S, K, DAP | Reichenbach, M. |
| SMR20 | SL1344 <i>aroA asd sipB</i> | S, K, DAP | Reichenbach, M. |
| SMR21 | SL1344 <i>aroA asd ssrB</i> | S, K, DAP | Reichenbach, M. |
| SMR22 | SL1344 <i>aroA asd sipB</i> | S, DAP | Reichenbach, M. |
| SMR23 | SL1344 <i>aroA asd ssrB</i> | S, DAP | Reichenbach, M. |

Escherichia coli Nissle 1917

| | | | |
|-----|--|---|-----------|
| EcN | <i>E. coli</i> (O6:K5:H1), Hly-, Mcm+ | — | Mutaflor® |
|-----|--|---|-----------|

Bakterienstämme, die für Teil 2 benötigt wurden:

| Bakt.Stamm | Genotyp | Resistenz/Zusatz | Quelle |
|-------------------------------|-------------------------|------------------|-----------------------------------|
| <u>Salmonella Typhimurium</u> | | | |
| SL1344 | Xyl, hisG, rspL | S | Hoiseth, S.K.; Stocker, B.A.D. |
| SDB7 | SL1344 <i>ssaGH</i> | S, K | Bumann, D. |
| SDB13 | SL1344 <i>asd</i> | S, K, DAP | Bumann, D. |
| SDB14 | SL1344 <i>aroA</i> | S, K | Bumann, D. |
| SDB15 | SL1344 <i>aroA</i> | S | Bumann, D. |
| SDB16 | SL1344 <i>aroA purA</i> | S, K | Bumann, D. |

MATERIAL

| | | | |
|-------|------------------------------|------------------|-----------------|
| SDB19 | SL1344 <i>aroA asd</i> | S, DAP | Bumann, D. |
| SDB68 | SL1344 <i>ubiE</i> | S, K | Bumann, D. |
| SDB90 | SL1344 <i>ubiC</i> | S, K | Bumann, D. |
| SMR3 | SL1344 <i>ssaGH asd</i> | S, K, DAP | Reichenbach, M. |
| SMR4 | SL1344 <i>ssaGH ribB</i> | S, K, Riboflavin | Reichenbach, M. |
| SMR5 | SL1344 <i>ssaGH ubiE</i> | S, K | Reichenbach, M. |
| SMR6 | SL1344 <i>ssaGH ubiC</i> | S, K | Reichenbach, M. |
| SMR7 | SL1344 <i>ssaGH trx</i> | S, K | Barat, S. |
| SMR8 | SL1344 <i>ssaGH ppk</i> | S, K | Barat, S. |
| SMR9 | SL1344 <i>aroA purA asd</i> | S, K, DAP | Reichenbach, M. |
| SMR10 | SL1344 <i>aroA purA ribB</i> | S, K, Riboflavin | Reichenbach, M. |
| SMR11 | SL1344 <i>aroA purA trx</i> | S, K | Barat, S. |
| SMR12 | SL1344 <i>aroA purA ppk</i> | S, K | Barat, S. |
| SMR13 | XL-10 pBAD22 <i>hipA</i> | S, K, Cam | Reichenbach, M. |

Escherichia coli

| | | |
|----------------|--------|------------|
| XL10-Gold KanR | K, Tet | Stratagene |
|----------------|--------|------------|

9.8 Plasmide

| Plasmid | Beschreibung | Quelle |
|---------------------|--|-----------------------|
| <u>Teil 2</u> | | |
| pAD123 | enthält stabiles GFP | [32] |
| pBAD18 | <i>P_{araC}</i> | [67] |
| pBAD22 <i>hipA</i> | <i>P_{araC}</i> , <i>hipA</i> Gen | Vasquesz-Laslop [201] |
| pBAD24 <i>hipA7</i> | <i>P_{araC}</i> , <i>hipA7</i> Allel | Hill, T. [100] |
| pBAD33 <i>relE</i> | <i>P_{araC}</i> , <i>relE</i> Gen | Gerdes, K. [17] |
| pKD46 | Lambda Red Rekombinase | [24] |
| CP20 | FLP-Rekombinase | [35] |

9.9 Versuchstiere

Teil 1

Alle Tierexperimente am Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung wurden unter SPF-Bedingungen gemäß den Richtlinien des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden weibliche Mäuse im Alter zwischen 8 und 12 Wochen verwendet. Die Tiere für die IL-10 Versuche waren mit einer definierten Darmflora (CRASF®) ohne *E. coli*-Stämme besiedelt. Diese wurde über CD1 Mäuse am HZI eingeführt. Die IL-10 Mutanten wurden anschließend über Embryonentransfer in die Tierhaltung eingebracht. Bei den Mutanten handelt es sich um IL-10^{-/-} (Axel Roers), IL-10^{fl/fl} CD4-Cre, IL-10^{fl/fl} LysM-Cre, IL-10R^{-/-}-K14-Cre (8.Generation), IL-10R^{fl/fl} CD4-Cre, IL-10R^{fl/fl} LysM-Cre, IL-10R^{fl/fl} CD19-Cre, IL-12 /IL-10^{fl/fl} CD4-Cre und IL-4 /IL-10^{fl/fl} CD4-Cre. Alle *knock-out*-Stämme waren im C57BL/6J Hintergrund. Der IL-10^{fl/fl}-Stamm war in der 10. Generation und der IL10R^{fl/fl} (Robert S. Jack) wurde nach Rückkreuzung in BALB/c einmal mit C57BL/6J verpaart. Bei den zelltypspezifischen *knock-outs* befanden sich CD4-Cre und CD19-Cre in der 10. Generation und LysM-Cre in der 8. Generation. Eine Übersicht über die Mausstämmen ist in Tabelle 9.1 aufgeführt.

| Bezeichnung | Abkürzung | Phänotyp | Referenz |
|---|-------------------------|--------------------------|----------|
| C57BL/6J | B6 | Wildtyp | |
| <i>ubiquitäre Knock-Out-Stämme</i> | | | |
| B6.129P2-Il4 ^{tm1Cgn} /J | IL-4 ^{-/-} | IL-4 knock-out | [107] |
| B6-Il10 ^{tm1Cgn} /J | IL-10 ^{-/-} | IL-10 knock-out | [106] |
| B6.129S1-Il12a ^{tm1Jm} /J | IL-12 ^{-/-} | IL-12 knock-out | [121] |
| <i>Stämme mit flox/flox</i> | | | |
| B6-Il10 ^{tm3Cgn} | IL-10 ^{fl/fl} | IL-10 flox | [186] |
| C;129P2-Il10 ^{tm1(flox)Greifswald} | IL-10R ^{fl/fl} | IL-10R flox | — |
| <i>Cre-Stämme</i> | | <i>Zelltypspezifität</i> | [107] |
| B6.D2-Tg(CD4-cre)1Cwi/J | Cd4-Cre | T-Zellen | [112] |
| B6-Cd19 ^{tm1(cre)Cgn} | Cd19-Cre | B-Zellen | [167] |
| B6;129P2-Lzm-s2 ^{tm1(cre)Cgn} | LysM-Cre | Makrophagen, Neutrophile | [18] |
| B6.D2-Tg(KRT14-cre)1Cgn | K14-Cre | Oozyten, Keratinozyten | [69] |

Tabelle 9.1: **Übersicht über die eingesetzten Mausstämmen** Alle Mausstämmen wurde am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung gezüchtet und gehalten.

Die C3H/HeJ-IL10^{-/-} Tiere und die entsprechenden Kontrolltiere C57BL/6J-IL10^{-/-} stammten von Andr Bleich aus einer Zucht des Zentralen Tierlabors der Medizinischen Hochschule in Hannover (MHH). Versuche mit diesen Tieren wurden unter SPF-Bedingungen an der MHH durchgeführt.

Teil 2

Die Persistenzversuche fanden an der Medizinischen Hochschule in Hannover statt. Für diese Experimente wurden von Charles River bezogene BALB/c Mäuse eingesetzt, die unter SPF-Bedingungen gehalten wurden. Verwendet wurden Weibchen die zu Versuchsbeginn im Alter von 8 bis 12 Wochen waren.

10. Methoden

10.1 Methoden zu Teil 1

10.1.1 Wachstumsbedingungen der Bakterienstämme

Eine Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstammes wurde 1 : 100 mit entsprechenden Antibiotika und Zusätzen in frisches LB-Medium überimpft und für ca. 4 Stunden bei 180 rpm schüttelnd inkubiert. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 2,4 bis 2,7 wurden die Bakterien bei 6000 rpm für 12 min. pelletiert und anschließend zweimal mit LB 3% NaHCO₃-Medium gewaschen und auf die gewünschte Infektionsdosis eingestellt.

Zum Inaktivieren der Bakterien wurden diese nach dem Ersten pelletieren in 2% igem Formaldehyd in PBS resuspendiert und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Vor dem Einstellen der Infektionsdosis wurde zweimal mit 1xPBS gewaschen.

Für die Behandlung mit Gentamycin wurde den Bakterien bei Erreichen der oben genannten Optischen Dichte Gentamycin mit einer Endkonzentration von 500 µg/ml zugefügt und anschließend für weitere 2 Stunden bei 37°C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Nach zweimaligem waschen mit LB 3% NaHCO₃, wie im ersten Absatz beschrieben, wurden die Bakterien auf die gewünschte Infektionsdosis eingestellt.

10.1.2 Infektionsmodell

Je nach Versuch wurde den Mäusen 1 x 10⁹ oder 5 x 10¹⁰ KBE des entsprechenden Bakterienstammes oral verabreicht. An verschiedenen Zeitpunkten nach Versuchsbeginn wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, um anschließend die PP zu isolieren.

10.1.3 Bestimmung der KBE

Die isolierten PP wurden in 1 ml PBS/ 2% FKS homogenisiert. Um die Zahl der intrazellulären Bakterien zu bestimmen, wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl 0,1 % Triton X-100 versetzt und in verschiedenen Verdünnungsstufen auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika und Zusätzen ausplattiert, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend ausgezählt.

10.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension (aus 10.1.3) 1:1 mit Trypanblau gemischt und in eine Neubauerzählkammer (10 µl) eingebracht. Das Auszählen von 32 Kleinquadraten ergab die Zellzahl $\times 10^4$ ml.

10.1.5 Durchflusszytometrische Analyse der PMN-Infiltration in die PP

Die verbliebenen 940 µl der Zellsuspension wurden für die Durchflusszytometrische Analyse zunächst abzentrifugiert (1400 rpm, 7 min, 4 °C, Ausschwingrotor) und anschließend mit den Primärantikörpern (PE Rat Anti-Mouse CD11b [BD, Cat.: 557397] 1:500, Biotin Rat Anti-Mouse Ly-6C [BD, Cat.: 557359] 1:400, FITC Rat Anti-Mouse Ly-6G [BD, Cat.: 551460] 1:200) für 20 min. auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift (2 ml PBS/ 2% FKS), schloss sich eine 10 minütige Inkubationszeit mit dem Sekundärantikörper (Streptavidin-allophycocyanin [Molecular Probes (MP), Cat.:S868] 1:1000) an. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 2 ml PBS/ 2% FKS gemischt und filtriert [Partec, Cell Trics Disposable Filters 30 m, Cat.: 04-004-2326], wobei mit 1 ml nachgespült wurde, und schließlich wieder pelletiert. Das entstandene Pellet wurde in 100 µl 1 x PBS resuspendiert und durch Zugabe von 100 µl PBS/ 2% Formaldehyd fixiert.

Alle Antikörper wurden in PBS/ 2% FKS/ 2% Mausserum verdünnt. Alle Arbeiten wurden lichtgeschützt und auf Eis durchgeführt. Für die Quantifizierung der Zellpopulationen wurde das FACSCalibur [BD biosciences] benutzt. Die Auswertung erfolgte mit FCS Express V2 [De Novo Software].

10.1.6 Immunhistochemie

Für immunhistochemische Färbungen wurde die Hälfte der isolierten PP zunächst in Tissue-Tek O.C.TTM [SAKURA] eingebettet und auf Trockeneis schock-gefroren. Mit dem Kryostat [LEICA CM30509] wurden Schnitte mit einer Dicke von 8 µm hergestellt. Vor der Färbung wurden sie für 20 min. mit eiskaltem Aceton oder für 10 min. mit 4% Formaldehyd fixiert, gewaschen und für ca. 1 Stunde geblockt. Anschließend wurden die Schnitte mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt. Alle Antikörper wurden in der Blockierlösung verdünnt. Die Inkubationszeit mit dem Primärantikörper betrug 1 Stunde, mit dem Sekundärantikörper 30 min. Um die Fluoreszenzintensität über einen längeren Zeitraum zu erhalten, erfolgte eine finale Fixierung mit 4% Formaldehyd für 20 min. Nach jedem Inkubationsschritt wurde dreimal gewaschen. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Moviol-DABCO [Fluka] eingedeckelt. Die gefärbten Schnitte wurden am Fluoreszenzmikroskop [OLYMPUS IX81] mit Hilfe der Software AnalySISD [OLYMPUS] aufgenommen und mit Photoshop CS [Microsoft] bearbeitet.

Blockierlösung

| | |
|-----------|---|
| 100 mg/ml | Blockierreagent [MP, Komponente D, TSA Kit, Cat.: T20926] |
| 2 % (v/v) | Mausserum |
| 1 x | TBS |

Waschpuffer

| | |
|--------------|-------|
| 1 x | TBS |
| 0,05 % (v/v) | Tween |

Primärantikörper

FITC rat anti-mouse Ly-6G [BD, Cat.: 551460]
 Anti-*Salmonella* Typhimurium [Sifin]
 Anti-O6-LPS [Robert-Koch-Institut Werningerode]

Sekundärantikörper

Alexa 488 goat anti-FITC IgG [MP, Cat.: A11096]

Alexa 647 goat anti-rabbit IgG [MP, Cat.: A21443]

Alexa 546 goat anti-rabbit IgG [MP, Cat.: A11010]

10.1.7 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse wurde GraphPad Prism 4 [GraphPad Software, Inc.] verwendet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% (*, $P < 0,05$) wurde ein Unterschied zwischen zwei zu analysierenden Datensätzen als signifikant bezeichnet, bei $P < 0,01$ (**) als sehr signifikant und bei $P < 0,001$ (***) als hoch signifikant. Nicht signifikante (n.s.) Werte waren $P > 0,05$. Für die Berechnung wurde der nicht-parametrische t-Test (Mann-Whitney U) eingesetzt.

10.2 Methoden zu Teil 2

10.2.1 Transformation via Elektroporation

Herstellung elektrokompetenter Zellen

Von einer Übernachtskultur des gewünschten Stammes wurde 1 : 100 in eine Tageskultur mit den entsprechenden Antibiotika oder Zusätzen überimpft und bei der erforderlichen Temperatur bei 180 rpm schüttelnd bis zu einer OD_{600} von 0,9 inkubiert. Dabei ergaben 100 ml Kultur am Ende ca. 200 μ l Zellen. Anschließend wurden die Bakterien in 50 ml-Falcons überführt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 20 minütigem pelletieren der Bakterien bei 6000 x g und 4 °C wurde jedes Pellet in 10 ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert. Es wurden immer 2 Falcons vereinigt bis nur noch 2 übrig geblieben sind. Der Waschvorgang mit eiskaltem ddH₂O wurde insgesamt 3 mal durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen für sofortige Verwendung in sehr wenig Restflüssigkeit resuspendiert und für die Elektroporation eingesetzt oder für die Lagerung bei –80 °C in 40% Glycerol gewaschen und in 10% Glycerol in 100 μ l Aliquots gelagert.

Transformation

100 µl der tiefgefrorenen elektrokompenten Zellen langsam auf Eis auftauen lassen oder 100 µl frische Zellen mit 1 µl Plasmid oder DNA-Fragment aus der PCR vermischen und in eine vorgekühlte 2 mm Küvette geben. Danach wurde bei folgenden Bedingungen transformiert: 2,5 kV, 25 µF und 400 mΩ [Gene Pulser, Biorad] und anschließend sofort 1 ml SOC-Medium zugeführt und in ein 1,5 ml Reagensgefäß zurück überführt. Nach 1h Inkubation bei 37 °C (bzw. 30 °C bei temperatursensitiven Plasmiden) und 350 rpm [Thermomixer, Eppendorf] wurden die Zellen durch Zentrifugieren auf maximaler Stufe aufkonzentriert. Das Pellet wurde in ca. 100 µl Restflüssigkeit resuspendiert und anschließend ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Klone gepickt und überprüft.

Alle Plasmide wurden zuerst in den *E. coli* XL-10 transformiert, da dieser Stamm aufgrund seines Hte-Phänotyps eine erhöhte Transformationseffizienz besitzt.

10.2.2 Bakterienmutantenerzeugung mittels PCR (Datsenko)

Hierbei wurde das Zielgen durch Rekombination mit einer Kanamycin-Kassette ausgetauscht [24]. In einer PCR Reaktion wurde die Kanamycinsequenz amplifiziert (Go-Taq-Polymerase von Promega). Die Primer für die Reaktion wurden so ausgewählt, dass sie 40 bp von Anfang und Ende des Zielgens sowie 20 bp der Kanamycin-Kassette enthielten. Die entsprechenden Sequenzen der *Salmonella*-Gene wurden in der Genomdatenbank www.tigr.org auf der Grundlage der Genomsequenz von *Salmonella* Typhimurium LT2 SGSC1412 recherchiert. Als DNA-Template für die PCR-Reaktion wurde aus einem Salmonellenstamm, welcher schon eine Kanamycin-Kassette enthielt, genomische DNA mit Hilfe des Plasmid Quick Pure Kits von Machery-Nagel isoliert.

PCR-Reaktion (1x)

| | |
|-----------------|------------------------------|
| 10 µl | 5x Puffer |
| 4 µl | 25 mM MgCl ₂ |
| 5 µl | 2 mM dNTPs |
| 1,5 µl | 10 pmol 5-> 3-Oligo |
| 1,5 µl | 10 pmol 3-> 5-Oligo |
| 0,25 µl | Go-Taq |
| 0,1 µl | DNA (Stamm mit Kan-Kassette) |
| <u>26,75 µl</u> | <u>dH₂O</u> |
| 50 µl | Gesamtvolumen |

METHODEN

Um eine ausreichende Menge an DNA für die anschließende Transformation zur Verfügung zu haben, wurden 500 µl von dem PCR Ansatz in Aliquots von 10 x 50 µl hergestellt.

Die ersten 10 Zyklen im PCR-Cycler-Programm wurden als Step-down PCR durchgeführt (*). Hierbei wurde die initiale Annealingtemperatur von 60°C bei jedem Zyklus um 1°C gesenkt. Es folgten weitere 30 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 50°C.

Thermocycler-Programm Vorlauf des Heizdeckels bei 110°C

| | | | |
|-------------------------------|------------------|--------------|-----------|
| <u>initiale Denaturierung</u> | <u>5 min.</u> | <u>94 °C</u> | |
| Denaturierung | 30 sek. | 94 °C | |
| Annealing | 30 sek. | 50 °C | 10 Zyklen |
| <u>Extension</u> | <u>45 sek.kb</u> | <u>72 °C</u> | |
| Denaturierung | 30 sek. | 94 °C | |
| Annealing | 30 sek. | 60 °C (*) | 30 Zyklen |
| <u>Extension</u> | <u>45 sek.kb</u> | <u>72 °C</u> | |
| finale Extension | 5 min. | 72 °C | |

Ein Aliquot des PCR-Ansatzes (3 µl) wurde anschließend in einem 1 % igen Agarosegel auf die korrekte Größe des amplifizierten Fragments hin überprüft. Die DNA aus dem restlichen Ansatz wurde mit Hilfe des Wizard SV PCR Clean-Up Kit (Promega) aufgereinigt und in einem Minimalvolumen von 15 µl in ddH₂O aufgenommen.

Das entstandene DNA-Fragment wurde nun mittels Elektroporation in den Zielstamm transformiert, welcher ein arabinoseinduzierbares temperatursensitives Plasmid mit Rekombinase (pKD46) enthielt. Bei der Herstellung der kompetenten Zellen wuchsen die Bakterien in LB-Medium mit 0,2 % L-Arabinose, um die Expression der Rekombinase zu induzieren. Der Ansatz wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9 wachsen gelassen, dann für 15 min. auf Eis inkubiert und 3 mal mit eiskaltem sterilem Wasser gewaschen (Zentrifugation: 20 min, 10.000rpm, 4°C). Die elektrokompetenten Zellen enthielten somit die notwendige Rekombinase. Nach der Transformation (2 mm Küvette, 2,5 kV, 25 µF, 400 mΩ) wurden die Bakterien für 1 Stunde bei 37°C und 350 rpm in SOC-Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die entstandenen Klone wurden in 7% DMSO aufgenommen und per PCR auf die Mutation hin untersucht.

10.2.3 Bakterienmutantenerzeugung mittels P22 Phagentransduktion

Mit Hilfe des Salmonellen spezifischen P22 HT Phagens kann eine Mutation von einem Salmonellenstamm auf einen anderen übertragen werden. Hier wurde die, für eine generelle Transduktion geeignetere, Phagenmutante P22 HT105/1 *int*-201 verwendet, da sie beliebige DNA-Fragmente in die neusynthetisierten Phagenköpfe verpackt. Somit können einige Phagen auch die Kanamycin-Kassette mit dem umliegenden Gensequenzen, enthalten, die dann eine Rekombination in das Genom des neuen Wirts ermöglichen.

Herstellung des Phagenlysats (nach S. Maloy):

Hierfür wurde der Donorstamm (1 ml) über Nacht in LB-Medium bei 30 °C und 350 rpm in einem Thermomixer schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 200 µl der Kultur mit 1 ml Phagenlösung gemischt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Bakterienlösung wurde 2 min. bei 14.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand entnommen und 100 µl Chloroform zugegeben, gevortext und anschließend bei 4 °C gelagert.

Bestimmung des Phagentiters:

Hierzu wurde eine EBU-Platte in 4 Sektoren abgeteilt. 2,5 ml Top-Agar wurden in der Mikrowelle kurz aufgeköcht und im Wasserbad auf 50 °C abkühlen gelassen. Wenn der Top-Agar die entsprechende Temperatur erreichte, wurden 100 µl SL1344 aus einer Übernachtskultur zugefügt, sofort gründlich vermischt und gleichmäßig auf die Platte gegossen. Während der TOP-Agar für ca. 30 min. trocknete, wurde eine Verdünnungsreihe des Phagens in sterilem 0,85% NaCl hergestellt. Anschließend wurden je 20 µl der Verdünnungen 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} und 10^{-9} in je einen Sektor getropft. Die Platte wurde für 30 min. stehen gelassen, damit der Phagentropfen trocknen konnte und schließlich über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plaques für jede der Verdünnungen gezählt und der Phagentiter (pfu/ml) anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1000 \mu\text{l}}{20 \mu\text{l} \times \text{ml}} = \text{pfu/ml}$$

Phagentransduktion:

Für die Transduktion wurden 200 µl einer Übernachtskultur des Rezipienten mit 1 µl, 5 µl bzw. 20 µl des Phagenlysats gemischt und 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 ml LB10mM EGTA (pH8.0) zugeführt und der Ansatz für 1 Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Schließlich wurde das Pellet in Restflüssigkeit resuspendiert und auf LB-Platten mit den entsprechenden selektiven Antibiotika ausplattiert und über Nacht

bei 37°C inkubiert. Die Klone wurden in 7% DMSO aufgenommen und mittels PCR (wie unter 10.2.4) getestet.

Überprüfen der Klone:

Mittels Kolonie-PCR (siehe 10.2.4) konnten die Klone auf die Mutation hin untersucht werden, indem Oligos verwendet wurden die außerhalb des Zielgens liegen. Durch den Austausch der Gensequenz mit der Kanamycinresistenz-Kassette erhielt man nun ein PCR-Fragment mit einer im Vergleich zum Wildtyp verschiedenen Länge.

Identifizierung von Bakterien mit Pseudolysogenen Phagen:

Um die positiven Klone von den Phagen zu befreien, wurden sie zweimal auf EBU-Platten ausgestrichen. EBU-Platten enthalten einen grünen Farbstoff der sich durch die, bei der phageninduzierten Lyse der Bakterien entstandene Säure, in einen blauen Farbstoff umwandelt. Kolonien, die auf diesen Platten weiss wachsen, enthalten keine Phagen mehr.

10.2.4 Kolonie – PCR

Zur Überprüfung des Erfolgs der Klonierung wurden von jedem klonierten Gen mehrere Klone gepickt und mittels Kolonie-PCR getestet. Dazu wurde jeder Klon in 100 µl 7% DMSO resuspendiert. Während 1 µl davon direkt für die Kontroll-PCR eingesetzt werden konnte, wurde bei einem positivem Ergebnis der Rest dazu verwendet, um eine Übernachtskultur anzusetzen, welche dann dazu diente eine Stammkultur des Klons herzustellen.

PCR-Reaktion (1x)

| | |
|---------------|-------------------------|
| 2 µl | 5x Puffer |
| 0,8 µl | 25 mM MgCl ₂ |
| 1 µl | 2 mM dNTPs |
| 0,5 µl | 10 pmol 5-> 3-Oligo |
| 0,5 µl | 10 pmol 3-> 5-Oligo |
| 0,1 µl | Go-Taq |
| 1 µl | DNA (Klon in DMSO) |
| <u>6,1 µl</u> | <u>dH₂O</u> |
| 10 µl | Gesamtvolumen |

METHODEN

Die ersten 10 Zyklen wurden als Step-down PCR durchgeführt (*). Hierbei wurde die initiale Annealingtemperatur von 60°C bei jedem Zyklus um 1°C gesenkt. Es folgten weitere 30 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 50°C.

Thermocycler-Programm Vorlauf des Heizdeckels bei 110°C

| | | | |
|-------------------------------|------------------|-------------|-----------|
| <u>initiale Denaturierung</u> | <u>5 min.</u> | <u>94°C</u> | |
| Denaturierung | 30 sek. | 94°C | |
| Annealing | 30 sek. | 50°C | 10 Zyklen |
| <u>Extension</u> | <u>45 sek.kb</u> | <u>72°C</u> | |
| Denaturierung | 30 sek. | 94°C | |
| Annealing | 30 sek. | 60°C (*) | 30 Zyklen |
| <u>Extension</u> | <u>45 sek.kb</u> | <u>72°C</u> | |
| finale Extension | 5 min. | 72°C | |

10.2.5 Wachstumsbedingungen der Bakterienstämme

Die gewünschten Bakterienstämme wurden in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika und Zusätzen über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien für 3 min. bei 6.000 x g abzentrifugiert und anschließend im gleichen Volumen an kommerziellem 1 x PBS (Gibco) resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Nach dem letzten Waschen wurde eine Infektionsdosis von 10⁶ KBE in 100 µl eingestellt. Bei einer kompetitiven Infektion wurde den Mäusen ein Gemisch aus zwei verschiedenen Bakterienstämmen verabreicht. Es handelte sich dabei meistens um eine 1 : 1 Mischung der Mutante und ihrem Parentalstamm. Dafür wurden die optischen Dichten beider Stämme vor dem Waschen bestimmt und anschließend eine 1 : 1 Mischung hergestellt. Nach dem folgenden Waschen wurde die Infektionsdosis eingestellt.

10.2.6 Infektionsmodell

Den Mäusen wurden 100 µl der Bakterienlösung *intra venös* (i.v.) appliziert. An den Tagen 1, 3 und 7 nach der Infektion wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Milz entnommen.

10.2.7 KBE-Bestimmung

Die entnommene Milz wurde in 1 ml PBS 0,3% Triton X-100 überführt. Mit Hilfe des Stem-
pels einer 5 ml-Einwegspritze wurde die Milz zerstört. Die entstandene Milzsuspension
wurde mehrfach verdünnt und ein Aliquot auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika
und Zusätzen ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht, oder länger wenn erforderlich,
bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde sie ausgezählt und die Zahl der KBE pro Milz
bestimmt.

Bei kompetitiven Infektionen wurden Aliquots der Verdünnung zum einen auf Streptomycin
enthaltenen LB- Platten ausplattiert und zum andern auf LB- Platten mit Streptomycin und
Kanamycin. Im Vergleich zum Parentalstamm enthalten die hier erzeugten Salmonellen-
mutanten eine Kanamycinresistenz- Kassetten anstelle des Zielgens. Die KBE des Parental-
stammes ergibt sich aus der Differenz der Koloniezahlen der Streptomycin und Kanamy-
cinplatten.

10.2.8 Arabinoseinduktion von Plasmiden

Enthielt der Bakterienstamm ein Plasmid bei dem das Gen hinter einem P_{araC} - Promotor
liegt, dann muss die Expression durch Zugabe von L-Arabinose induziert werden. Dazu
wurde der Stamm 1 : 200 von einer Übernachtskultur in frisches Medium überimpft und bei
37°C (Ausnahme: temperatursensitive Plasmide, z.B. pKD46 bei 30°C) schüttelnd inku-
biert. Beim Erreichen einer OD_{600} von 0,5 (ca. 2,5 Stunden) wurde L-Arabinose in einer
Endkonzentration von 0,2% zugegeben (10% Stammlösung), um den Promotor zu aktivie-
ren.

10.2.9 SPI 1- Induktion mittels M9-Mangelmedium

Das M9 Mangelmedium diente dazu die Expression der frühen Virulenzgene von *Salmo-
nella* Typhimurium zu induzieren, indem es einem *in vivo* Zustand ähnelt. Von einer LB-
Übernachtskultur wurde 1 : 200 in M9 Mangelmedium mit $MgSO_4$ (pH 6,0) überimpft und
erneut über Nacht wachsen lassen. Am folgenden Tag wurde von dieser Kultur 1 : 100 in
M9 Mangelmedium ohne $MgSO_4$ (pH 5,8) überimpft.

10.2.10 Generierung des arabinoseinduzierbaren pBAD18 GFP Plasmids

Um die Funktionsfähigkeit des arabinoseinduzierbaren pBAD Plasmids in SL1344 zu testen, wurde ein Gen, das für eine stabile Variante von GFP kodiert, hinter den Arabinose-abhängigen Promotor kloniert. Dafür wurde das Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen Xba I und Hind III geschnitten. Das GFP stammt aus dem pAD123 Plasmid [32] und wurde mit den gleichen Enzymen aus dem Plasmid entfernt. Mit Hilfe der T4 DNA Ligase wurden beide Fragmente nach Aufreinigung in einem 1% igen Agarosegel miteinander ligiert.

| <u>Doppel-Restriktionsverdau</u> | | <u>Ligationsansatz</u> | |
|----------------------------------|------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| 10 µl | Plasmid (pBAD18 bzw. pAD123) | 4 µl | pBAD18- Plasmid |
| 3 µl | 10 x Tango Puffer [*] | 2 µl | GFP- Fragment |
| 3 µl | Xba I (10U/l) [*] | 1 µl | T4 DNA Ligase [*] |
| 6 µl | Hind III (10U/l) [*] | 1,5 µl | Ligase-Puffer [*] |
| 8 µl | <u>ddH₂O</u> | 6,5 µl | <u>ddH₂O</u> |
| 30 µl | Gesamtvolumen | 15 µl | Gesamtvolumen |
| Inkubation über Nacht bei 37°C | | Inkubation für 20 min. bei 20°C | |

[*] Fermentas

Nach den Restriktionsverdauen wurden diese mit Ladepuffer auf einem 1% igen Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Wizard SV Gel Extraktions-Kits [Promega] aufgereinigt. Der Ligationsansatz wurde vor der Transformation ebenfalls noch einmal mit dem Wizard SV PCR Clean-Up Kit [Promega] aufgereinigt.

Anschließend wurde das Plasmid in XL-10 transformiert. Nach erfolgreicher Isolierung mit Hilfe eines Plasmid-Minipräparations-Kits [Plasmid dna-OLS, OLS] wurde das Plasmid in den SL1344 via Elektroporation eingebracht (Elektroporation siehe 10.2.1).

10.2.11 Durchflusszytometrische Bestimmung der GFP – Fluoreszenz

Wie unter 10.2.8 beschrieben, wurden die Stämme mit dem arabinoseinduzierbaren GFP-Plasmid zur Expression des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) angeregt. 1h, 2h, 4h und

METHODEN

über Nacht nach der Induktion wurde dem Ansatz 1 μ l entnommen und in ein FACS-Röhrchen mit 400 μ l 1 x PBS/ 1% Formaldehyd, zur Fixierung, überführt. Im FACS Calibur wurden die Zellen anhand ihrer Fluoreszenz (FL1-Kanal) und Größe (FSC-Kanal) analysiert und graphisch dargestellt.

Literaturverzeichnis

- [1] H Harizi ad M Juzan, V Pitard, JF Moreau, and N Gualde. Cyclooxygenase-2-issued prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J Immunol*, 168(5), Mar 2002.
- [2] BM Ahmer, J van Reeuwijk, PR Watson, TS Wallis, and F Heffron. *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. *Mol Microbiol*, 31(3), Feb 1999.
- [3] R Athman and D Philpott. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol*, 7(1), Feb 2004.
- [4] Daniel Becker, Matthias Selbach, Claudia Rollenhagen, Matthias Ballmaier, Thomas F Meyer, Matthias Mann, and Dirk Bumann. Robust *Salmonella* metabolism limits possibilities for new antimicrobials. *Nature*, 440(16), Mar 2006.
- [5] Y Belkaid, CA Piccirillo, S Mendez, EM Shevach, and DL Sacks. CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature*, 420(6915), Dec 2002.
- [6] DJ Berg, N Davidson, R Kuehn, W Mueller, S Menon, G Holland, L Thompson-Snipes, MW Leach, and D Rennick. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest*, 98(4), Aug 1996.
- [7] RD Berg. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*, 4(11), Nov 1996.
- [8] Bruce Beutler. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, 430, Jul 2004.
- [9] Eva Bjur, Sofia Eriksson-Ydberg nd Fredrik Aslund, and Mikael Rhen. Thioredoxin 1 Promotes Intracellular Replication and Virulence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, 74(9), Sept 2006.
- [10] DS Black, AJ Kelly, MJ Mardis, and HS Moyed. Structure and organization of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J Bacteriol*, 173(18), Sep 1991.
- [11] JM Blackwell. Structure and function of the natural-resistance-associated macrophage protein (Nramp1), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility. *Mol Med Today*, 2(5), May 1996.

LITERATURVERZEICHNIS

- [12] EF Boyd, FS Wang, TS Whittam, and RK Selander. Molecular genetic relationships of the salmonellae. *Appl Environ Microbiol*, 62(3), Mar 1996.
- [13] E Cario. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut*, 54(8), Aug 2005.
- [14] M Chamailard, SE Girardin, J Viala, and DJ Philpott. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiology*, 5(9), Sept 2003.
- [15] S Chamnongpol, M Cromie, and EA Groisman. Mg^{2+} sensing by the Mg^{2+} sensor PhoQ of *Salmonella enterica*. *J Mol Biol*, 325(4), Jan 2003.
- [16] C Cheminay, D Chakravorty, and M Hensel. Role of neutrophils in murine salmonellosis. *Infect Immun*, 72(1), Jan 2004.
- [17] SK Christensen, K Pedersen, FG Hansen, and K Gerdes. Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *J Mol Biol*, 332(4), Sep 2003.
- [18] BE Clausen, C Burkhardt, W Reith, R Renkawitz, and I Forster. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res*, 8, 1999.
- [19] MO Clements, S Eriksson, A Thompson, S Lucchini, JC Hinton, S Normark, and M Rhen. Polynucleotide phosphorylase is a global regulator of virulence and persistency in *Salmonella enterica*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(13), Jun 2002.
- [20] S Corinti, C Albanesi, A la Sala, S Pastore, and G Girolomoni. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol*, 166(4), Apr 2001.
- [21] FF Correia, A DOnofrio, T Rejtar, L Li, BL Karger, K Makarova, EV Koonin, and K Lewis. Kinase activity of overexpressed HipA is required for growth arrest and multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 188(24), Dec 2006.
- [22] RA Crossley, DJ Gaskin, K Holmes, F Mulholland, JM Wells, DJ Kelly, AH van Vliet, and NJ Walton. Riboflavin biosynthesis is associated with assimilatory ferric reduction and iron acquisition by *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*, 73(24), Dec 2007.
- [23] JA Crump, SP Luby, and ED Mintz. The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ*, 82(5), May 2004.
- [24] KA Datsenko and BL Wanner. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(12), Jun 2000.
- [25] DW Day, BK Mandal, and BC Morson. The rectal biopsy appearances in *Salmonella colitis*. *Histopathology*, 2(2), Mar 1978.

LITERATURVERZEICHNIS

- [26] EC de Jong, PL Vieira, P Kalinski, JH Schuitemaker, Y Tanaka, EA Wierenga, M Yazdanbakhsh, and ML Kapsenberg. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells *in vitro* with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol*, 168(4), Feb 2002.
- [27] TL Denning, NA Campbell, F Song, RP Garofalo, GR Klimpel, VE Reyes, and PB Ernst. Expression of IL-10 receptors on epithelial cells from the murine small and large intestine. *Int Immunol*, 12(2), Feb 2000.
- [28] L Ding and EM Shevach. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol*, 148(10), May 1992.
- [29] RP Donnelly, F Sheikh, SV Kotenko, and H Dickensheets. The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. *J Leukoc Biol*, 76(2), Aug 2004.
- [30] D Dreher, M Kok, C Obregon, SG Kiama, P Gehr, and LP Nicod. *Salmonella* virulence factor SipB induces activation and release of IL-18 in human dendritic cells. *J Leukoc Biol*, 72(4), Oct 2002.
- [31] JP Drenth and JW van der Meer. The inflammasome—a lineabacker of innate defense. *N Engl J Med*, 355(7), Aug 2006.
- [32] Anne K Dunn, Amy K Klimowicz, and Jo Handelsman. Use of a Promoter Trap To Identify *Bacillus cereus* Genes Regulated by Tomato Seed Exudate and a Rhizosphere Resident, *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl Environ Microbiol*, 69(2), Feb 2003.
- [33] SJ Dunstan, VA Ho, CM Duc, MN Lanh, CX Phuong, C Luxemburger, J Wain, F Dudbridge, CS Peacock, D House, C Parry, TT Hien, G Dougan, J Farrar, and JM Blackwell. Typhoid fever and genetic polymorphisms at the natural resistance-associated macrophage protein 1. *J Infect Dis*, 183(7), Apr 2001.
- [34] SJ Dunstan, CP Simmons, and RA Strugnell. Comparison of the abilities of different attenuated *Salmonella* typhimurium strains to elicit humoral immune responses against a heterologous antigen. *Infect Immun*, 66(2), Feb 1998.
- [35] Deborah J Eaves, Vito Ricci, and Laura J V Piddock. Expression of *acrB*, *acrF*, *acrD*, *marA*, and *soxS* in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium: Role in Multiple Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(4), 2004.
- [36] CD Ellermeier, A Janakiraman, and JM Slauch. Construction of targeted single copy lac fusions using lambda Red and FLP-mediated site-specific recombination in bacteria. *Gene*, 290(1), May 2002.
- [37] P Everest, J Allen, A Papakonstantinou, P Mastroeni, M Roberts, and G Dougan. *Salmonella* typhimurium infections in mice deficient in interleukin-4 production: role of IL-4 in infection-associated pathology. *J Immunol*, 159(4), Aug 1997.

LITERATURVERZEICHNIS

- [38] P Everest, J Ketley, S Hardy, G Douce, S Khan, J Shea, D Holden, D Maskell, and G Dougan. Evaluation of *Salmonella* typhimurium mutants in a model of experimental gastroenteritis. *Infect Immun*, 67(6), Jun 1999.
- [39] TJ Falla and I Chopra. Joint tolerance to beta-lactam and fluoroquinolone antibiotics in *Escherichia coli* results from overexpression of hipA. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(12), Dec 1998.
- [40] X Fan, H Gunasena, Z Cheng, R Espejo, SE Crowe, PB Ernst, and VE Reyes. Helicobacter pylori urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J Immunol*, 165(4), Aug 2000.
- [41] MA Farmer, JP Sundberg, IJ Bristol, GA Churchill, R Li, CO Elson, and EH Leiter. A major quantitative trait locus on chromosome 3 controls colitis severity in IL-10-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(24), Nov 2001.
- [42] MA Farmer, JP Sundberg, IJ Bristol, GA Churchill, R Li, CO Elson, and EH Leiter. A major quantitative trait locus on chromosome 3 controls colitis severity in IL-10-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(24), Nov 2001.
- [43] AM O Farrell, Y Liu, KW Moore, and AL Mui. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *EMBO J*, 17(4), Feb 1998.
- [44] Nicolas Fasnacht. Analysis of mice infected with *Trichuris muris*. *Medizinische Hochschule Hannover*, 2008.
- [45] H Fickenscher, S Hoer, H Kuepers, A Knappe, S Wittmann, and H Sticht. The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol*, 23(2), Feb 2002.
- [46] DS Finbloom and KD Winestock. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol*, 155(3), Aug 1995.
- [47] DF Fiorentino, MW Bond, and TR Mosmann. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 170(6), Dec 1989.
- [48] DF Fiorentino, A Zlotnik, P Vieira, TR Mosmann, M Howard, KW Moore, and A O Garra. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol*, 146(10), May 1991.
- [49] JR Forbes and P Gros. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol*, 9(8), Aug 2001.
- [50] CH Fox, FB Johnson, J Whiting, and PP Roller. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem*, 33(8), Aug 1985.

LITERATURVERZEICHNIS

- [51] AJ Frost, AP Bland, and TS Wallis. The early dynamic response of the calf ileal epithelium to *Salmonella* Typhimurium. *Vet Pathol*, 34(5), Sep 1997.
- [52] JE Galan. Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr Opin Microbiol*, 2, 1999.
- [53] Andy Garder, Sturt A West, and Ashleigh S Griffin. Is Bacterial Persistence a Social Trait? *PLoS ONE*, 8(752), Aug 2007.
- [54] A O Garra and P Vieira. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol*, 7(6), June 2007.
- [55] P Garside and AM Mowat. Mechanisms of oral tolerance. *Crit Rev Immunol*, 17(2), 1997.
- [56] RT Gazzinelli, M Wysocka, S Hieny, T Scharton-Kersten, A Cheever, R Kuehn, W Mueller, G Trinchieri, and A Sher. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol*, 157(2), July 1995.
- [57] RT Gazzinelli, M Wysocka, S Hieny, T Scharton-Kersten, A Cheever, R Kuehn, W Mueller, G Trinchieri, and A Sher. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol*, 157(2), 1996.
- [58] K Gerdes, SK Christensen, and A Loebner-Olesen. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol*, 3(5), May 2005.
- [59] AT Gewirtz, AM Siber, JL Madara, and BA McCormick. Orchestration of neutrophil movement by intestinal epithelial cells in response to *Salmonella* typhimurium can be uncoupled from bacterial internalization. *Infect Immun*, 67(2), Feb 1999.
- [60] E Gollub, H Zalkin, and DB Sprinson. Correlation of genes and enzymes, and studies on regulation of the aromatic pathway in *Salmonella*. *J Biol Chem*, 242(22), Nov 1967.
- [61] Marina Greweling. Functional Analysis of the Interleukin-10 (IL-10) Network by Induction of Colitis in Conditional IL-10 and IL-10 Receptor Knock-Out Mice. *Tieraerztliche Hochschule Hannover*, 2007.
- [62] EA Groisman and H Ochman. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol*, 5(9), Sept 1997.
- [63] S Gruenheid, E Pinner, M Desjardins, and P Gros. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med*, 185(4), Feb 1997.

LITERATURVERZEICHNIS

- [64] F Guarner. Enteric flora in health and disease. *Digestion*, 73(Suppl1), Feb 2006.
- [65] F Guarner and JR Malagelada. Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361(9356), Feb 2003.
- [66] JS Gunn and SI Miller. PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J Bacteriol*, 178(23), Dec 1996.
- [67] LM Guzman, D Belin, M Carson, and J Beckwith. pBAD18. *J Bacteriol*, 177, 1995.
- [68] LM Guzman, D Belin, MJ Carson, and J Beckwith. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol*, 177(14), Jul 1995.
- [69] M Hafner, J Wenk, A Nenci, M Pasparakis, K Scharffetter-Kochanek, N Smyth, T Peters, D Kess, O Holtkoetter, and P Shephard. Keratin 14 Cre transgenic mice authenticate keratin 14 as an oocyteexpressed protein. *Genesis*, 38, 2004.
- [70] S Halle, D Bumann, H Herbrand, Y Willer, S Daehne, R Foerster, and O Pabst. Solitary intestinal lymphoid tissue provides a productive port of entry for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun*, 75(4), Apr 2007.
- [71] S Hapfelmeier, K Ehrbar, B Stecher, M Barthel, M Kremer, and WD Hardt. Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun*, 72(2), Feb 2004.
- [72] S Hapfelmeier, B Stecher, M Barthel, M Kremer, AJ Mueller, M Heikenwalder, T Stallmach, M Hensel, K Pfeffer, S Akira, and WD Hardt. The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol*, 174(3), Feb 2005.
- [73] PR Harris, HL Mobley, GI Perez-Perez, MJ Blaser, and PD Smith. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology*, 111(2), Aug 1996.
- [74] F Hayes. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science*, 301(5639), Sep 2003.
- [75] MM Heimesaat, A Fischer, HK Jahn, J Niebergall, M Freudenberg, M Blaut, O Liesenfeld, RR Schumann, UB Goebel, and S Bereswill. Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*. *Gut*, 56(7), Jul 2007.
- [76] RB Henderson, JA Hobbs, M Mathies, and N Hogg. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood*, 102(1), Jul 2003.

LITERATURVERZEICHNIS

- [77] D Hersh, DM Monack, MR Smith, N Ghori, S Falkow, and A Zychlinsky. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(5), May 2002.
- [78] J Hess, C Ladel, D Miko, and SH Kaufmann. *Salmonella typhimurium* aroA- infection in gene-targeted immunodeficient mice: major role of CD4+ TCR-alpha beta cells and IFN-gamma in bacterial clearance independent of intracellular location. *J Immunol*, 156(9), May 1996.
- [79] Jill A Hoffman, Julie L Badger, Yan Zhang, and Kwang Sik Kim. *Escherichia coli* K1 purA and sorC are preferentially expressed upon association with human brain microvascular endothelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 31, Jul 2001.
- [80] SK Hoiseth and BA Stocker. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*, 291(5812), May 1981.
- [81] N Van Houten and SF Blake. Direct measurement of anergy of antigen-specific T cells following oral tolerance induction. *J Immunol*, 157(4), Aug 1996.
- [82] FC Huang, A Werne, Q Li, EE Galyov, WA Walker, and BJ Cherayil. Cooperative interactions between flagellin and SopE2 in the epithelial interleukin-8 response to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection. *Infect Immun*, 72(9), Sept 2004.
- [83] CJ Hueck. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(2), June 1998.
- [84] CA Hunter, LA Ellis-Neyes, T Slifer, S Kanaly, G Gruenig, M Fort, D Rennick, and FG Araujo. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 158(6), Apr 1997.
- [85] CA Hunter, LA Ellis-Neyes, T Slifer, S Kanaly, G Gruenig, M Fort, D Rennick, and FG Araujo. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 158(7), Apr 1997.
- [86] BP Hurley and B A McCormick. Translating tissue culture results into animal models: the case of *Salmonella typhimurium*. *Trends Microbiol*, 11, 2003.
- [87] A Iwasaki and BL Kelsall. Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J Immunol*, 166(8), Apr 2001.
- [88] MH Jang, MN Kweon, K Iwatani, M Yamamoto, K Terahara, C Sasakawa, T Suzuki, T Nochi, Y Yokota, PD Rennert, T Hiroi, H Tamagawa, H Iijima, J Kunisawa, Y Yuki, and H Kiyono. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(16), Apr 2004.
- [89] K Kagaya, K Watanabe, and Y Fukazawa. Capacity of recombinant gamma interferon to activate macrophages for *Salmonella*-killing activity. *Infect Immun*, 57(2), Feb 1989.

LITERATURVERZEICHNIS

- [90] D Kampik, R Schulte, and IB Autenrieth. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in *Yersinia* infections. *Infect Immun*, 68(5), May 2000.
- [91] K Kaniga, S Tucker, D Trollinger, and JE Galan. Homologs of the *Shigella* IpaB and IpaC invasins are required for *Salmonella* typhimurium entry into cultured epithelial cells. *J Bacteriol*, 177(14), Jul 1995.
- [92] KL Karem, S Kanangat, and BT Rouse. Cytokine expression in the gut associated lymphoid tissue after oral administration of attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Vaccine*, 14(16), Nov 1996.
- [93] T Karrasch, JS Kim, BI Jang, and C Jobin. The flavonoid luteolin worsens chemical-induced colitis in NF-kappaB(EGFP) transgenic mice through blockade of NF-kappaB-dependent protective molecules. *PLoS ONE*, 2(7), July 2007.
- [94] T Karrasch, JS Kim, M Muhlbauer, ST Magness, and C Jobin. Gnotobiotic IL-10-/-;NF-kappa B(EGFP) mice reveal the critical role of TLR/NF-kappa B signaling in commensal bacteria-induced colitis. *J Immunol*, 178(10), May 2007.
- [95] D Kelly, S Conway, and R Aminov. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends Microbiol*, 26(6), Jun 2005.
- [96] Kwang-Seo Kim, Narayana N Rao, Cresson D Fraley, and Arthur Kornberg. Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. *PNAS*, 99(11), May 2002.
- [97] TG Kimbrough and SI Miller. Assembly of the type III secretion needle complex of *Salmonella* typhimurium. *Microbes Infect*, 4(1), Jan 2002.
- [98] M Kobayashi, MN Kweon, H Kuwata, RD Schreiber, H Kiyono, K Takeda, and S Akira. Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J Clin Invest*, 111(9), May 2003.
- [99] K Komoriya, N Shibano, T Higano, N Azuma, S Yamaguchi, and SI Aizawa. Flagellar proteins and type III-exported virulence factors are the predominant proteins secreted into the culture media of *Salmonella* typhimurium. *Mol Microbiol*, 34(4), Nov 1999.
- [100] SB Korch, TA Henderson, and TM Hill. Characterization of the *hipA7* allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol Microbiol*, 50(4), Nov 2003.
- [101] SB Korch, TA Henderson, and TM Hill. Characterization of the *hipA7* allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol Microbiol*, 50(4), Nov 2003.

LITERATURVERZEICHNIS

- [102] HJ Krammer, H Kaemper, R von Buenau, E Zieseniss, C Stange, F Schlieger, I Clever, and J Schulze. Probiotic drug therapy with *E. coli* strain Nissle 1917 (EcN): results of a prospective study of the records of 3,807 patients. *Z Gastroenterol*, 44(8), Aug 2006.
- [103] T Kubori, A Sukhan, SI Aizawa, and JE Galn. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(18), Aug 2000.
- [104] R Kuehn, J Loehler, D Rennick, K Rajewsky, and W Mueller. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75(2), Oct 1993.
- [105] R Kuehn, J Loehler, D Rennick, K Rajewsky, and W Mueller:. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75, 1993.
- [106] R Kuhn, J Lohler, D Rennick, K Rajewsky, and W Muller. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75, 1993.
- [107] R Kuhn, K Rajewsky, and W Muller. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science*, 254, 1991.
- [108] MC Kullberg, JM Ward, PL Gorelick, P Caspar, S Hieny, A Cheever, D Jankovic, and A Sher:. *Helicobacter hepaticus* triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism. *Infect Immun*, 66, 1998.
- [109] E Kussell, R Kishony, NQ Balaban, and S Leibler. Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. *Genetics*, 169(4), Apr 2005.
- [110] Maria Lara-Tejero, Fayyaz Sutterwala, Yasunori Ogura, Ethan P Grant, John Bertin, Anthony J Coyle, Richard A Flavell, and Jorge E Galn. Role of the caspase-1 inflammasome in *Salmonella* typhimurium pathogenesis. *Rockefeller University Press*, 203(6), May 2006.
- [111] CA Lee, M Silva, AM Siber, AJ Kelly, E Galyov, and BA McCormick. A secreted Salmonella protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(22), Oct 2000.
- [112] PP Lee, DR Fitzpatrick, C Beard, HK Jessup, S Lehar, KW Makar, M Perez-Melgosa, MT Sweetser, MS Schlissel, and S Nguyen. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity*, 15, 2001.
- [113] S Lejona, ME Castelli, ML Cabeza, LJ Kenney, E Garca Vscovi, and FC Soncini. PhoP can activate its target genes in a PhoQ-independent manner. *J Bacteriol*, 186(8), Apr 2004.
- [114] K Lewis. Persister Cells and the Riddle of Biofilm Survival. *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), 2005.
- [115] Kim Lewis. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature*, 5, Jan 2007.

LITERATURVERZEICHNIS

- [116] O Liesenfeld, JC Kosek, and Y Suzuki. Gamma interferon induces Fas-dependent apoptosis of Peyer's patch T cells in mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*, 65(11), Nov 1997.
- [117] SW Lindgren, I Stojiljkovic, and F Heffron. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(9), Apr 1996.
- [118] SE Macatonia, TM Doherty, SC Knight, and A O Garra. Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol*, 150(9), May 1993.
- [119] AJ Macpherson and T Uhr. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, 303(5664), Mar 2004.
- [120] M Maehler and EH Leiter. Genetic and environmental context determines the course of colitis developing in IL-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis*, 8(5), September 2002.
- [121] J Magram, SE Connaughton, RR Warriar, DM Carvajal, CY Wu, J Ferrante, C Stewart, U Sarmiento, DA Faherty, and MK Gately. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity*, 4, 1996.
- [122] LH Makala, N Suzuki, and H Nagasawa. Peyer's patches: organized lymphoid structures for the induction of mucosal immune responses in the intestine. *Pathobiology*, 70(2), Dec 2002.
- [123] TC Marlovits, T Kubori, A Sukhan, DR Thomas, JE Galn, and VM Unger. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science*, 306(5698), Nov 2004.
- [124] C Martinoli, A Chiavelli, and M Rescigno. Entry route of *Salmonella typhimurium* directs the type of induced immune response. *Immunity*, 27(6), Dec 2007.
- [125] P Mastroeni and N Menager. Development of acquired immunity to *Salmonella*. *J Med Microbiol*, 52(6), Jun 2003.
- [126] SR McColl and I Clark-Lewis. Inhibition of murine neutrophil recruitment *in vivo* by CXC chemokine receptor antagonists. *J Immunol*, 163(5), Sep 1999.
- [127] BA McCormick, PM Hofman, J Kim, DK Carnes, SI Miller, and JL Madara. Surface attachment of *Salmonella typhimurium* to intestinal epithelia imprints the subepithelial matrix with gradients chemotactic for neutrophils. *J Cell Biol*, 131(6), Dec 1995.
- [128] BA McCormick, SI Miller, D Carnes, and JL Madara. Transepithelial signaling to neutrophils by salmonellae: a novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infect Immun*, 63(6), Jun 1995.
- [129] VJ McGovern and LJ Slavutin. Pathology of *salmonella* colitis. *Am J Surg Pathol*, 3(6), Dec 1979.
- [130] ND McKelvie, R Stratford, T Wu, T Bellaby, E Aldred, NJ Hughes, SN Chatfield, D Pickard, C Hale, G Dougan, and SA Khan. Expression of heterologous antigens in *Salmonella Typhimurium* vaccine vectors using the *in vivo*-inducible, SPI-2 promoter, *ssaG*. *Vaccine*, 22(25), Sep 2004.

LITERATURVERZEICHNIS

- [131] DM Monack, DM Bouley, and S Falkow. *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nramp1^{+/+} mice and can be reactivated by IFN γ neutralization. *J Exp Med*, 199(2), Jan 2004.
- [132] DM Monack, D Hersh, N Ghori, D Bouley, A Zychlinsky, and S Falkow. *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *J Exp Med*, 192(2), July 2000.
- [133] DM Monack, A Mueller, and S Falkow. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol*, 2(9), Sep 2004.
- [134] DM Monack, B Raupach, AE Hromockyj, and S Falkow. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(18), Sep 1996.
- [135] KW Moore, R de Waal Malefyt, RL Coffman, and A O Garra. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19, 2001.
- [136] HS Moyed and KP Bertrand. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol*, 155(2), Aug 1983.
- [137] HS Moyed and SH Broderick. Molecular cloning and expression of *hipA*, a gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol*, 166(3), May 1986.
- [138] PJ Murray and RA Young. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun*, 67(6), June 1999.
- [139] RA Murray and CA Lee. Invasion genes are not required for *Salmonella enterica* serovar typhimurium to breach the intestinal epithelium: evidence that *salmonella* pathogenicity island 1 has alternative functions during infection. *Infect Immun*, 68(9), Sep 2000.
- [140] JH Niess, S Brand, X Gu, L Landsman, S Jung, BA McCormick, JM Vyas, M Boes, HL Ploegh, JG Fox, D Littman, and HC Reinecker. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, 307(5707), Jan 2005.
- [141] FA Norris, MP Wilson, TS Wallis, EE Galyov, and PW Majerus. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(24), Nov 1998.
- [142] D O'Callaghan, D Maskell, FY Liew, CS Easmon, and G Dougan. Characterization of aromatic- and purine-dependent *Salmonella typhimurium*: attention, persistence, and ability to induce protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun*, 56(2), Feb 1988.
- [143] A O'Garra, PL Vieira, P Vieira, and AE Goldfeld. IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest*, 114(10), Nov 2004.

LITERATURVERZEICHNIS

- [144] ME Ohi and SI Miller. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med*, 52, 2001.
- [145] JM Otte, E Cario, and DK Podolsky. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 126(4), Apr 2004.
- [146] EM Palsson-McDermott and LA O'Neill. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, 113(2), Oct 2004.
- [147] EM Palsson-McDermott and LA O'Neill. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, 113(2), Oct 2004.
- [148] T Pang, ZA Bhutta, BB Finlay, and M Altwegg. Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol*, 3(7), Jul 1995.
- [149] T Pang, ZA Bhutta, BB Finlay, and M Altwegg. Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol*, 3(7), Jul 1995.
- [150] T Pang, MM Levine, B Ivanoff, J Wain, and BB Finlay. Typhoid fever important issues still remain. *Trends Microbiol*, 6(4), Apr 1998.
- [151] OJ Perdomo, JM Cavaillon, M Huerre, H Ohayon, P Gounon, and PJ Sansonetti. Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. *J Exp Med*, 180(4), Oct 1994.
- [152] P Perron-Savard, G De Crescenzo, and H Le Moual. Dimerization and DNA binding of the *Salmonella enterica* PhoP response regulator are phosphorylation independent. *Microbiology*, 151(12), Dec 2005.
- [153] A Poltorak, X He, I Smirnova, MY Liu, C Van Huffel, X Du, D Birdwell, E Alejos, M Silva, C Galanos, M Freudenberg, P Ricciardi-Castagnoli, B Layton, and B Beutler. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282(5396), Dec 1998.
- [154] MY Popoff. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. *Pasteur Institute*, ed. Paris(8), 2001.
- [155] Marian Price-Carter, Thomas G Fazio, Ester Ibanez Vallbona, and John R Roth. Polyphosphate Kinase Protects *Salmonella enterica* from Weak Organic Acid Stress. *Journal of Bacteriology*, 187(9), May 2005.
- [156] S Rakoff-Nahoum, L Hao, and R Medzhitov. Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity*, 25(2), Aug 2006.
- [157] S Rakoff-Nahoum and R Medzhitov. Role of the innate immune system and host-commensal mutualism. *Curr Top Microbiol Immunol*, 308, 2006.

- [158] S Rakoff-Nahoum, J Paglino, F Eslami-Varzaneh, S Edberg, and R Medzhitov. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 229(2), Jul 2004.
- [159] S Rakoff-Nahoum, J Paglino, F Eslami-Varzaneh, S Edberg, and R Medzhitov. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2), Jul 2004.
- [160] S Rakoff-Nahoum, J Paglino, F Eslami-Varzaneh, S Edberg, and R Medzhitov. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2), Jul 2004.
- [161] L Ramarathinam, RA Shaban, DW Niesel, and GR Klimpel. Interferon gamma (IFN-gamma) production by gut-associated lymphoid tissue and spleen following oral *Salmonella* typhimurium challenge. *Microb Pathog*, 11(5), Nov 1991.
- [162] SJ Rasmussen, L Eckmann, AJ Quayle, L Shen, YX Zhang, DJ Anderson, J Fierer, RS Stephens, and MF Kagnoff. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Invest*, 99(1), Jan 1997.
- [163] M Rescigno, M Urbano, B Valzasina, M Francolini, G Rotta, R Bonasio, F Granucci, JP Kraehenbuhl, and P Ricciardi-Castagnoli. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*, 2(4), Apr 2001.
- [164] M Rhen, S Eriksson, M Clements, S Bergstroem, and SJ Normark. The basis of persistent bacterial infections. *Trends Microbiol*, 11(2), Feb 2003.
- [165] G Richter, R Volk, C Krieger, W Lahm, U Roethlisberger, and A Bacher. Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, and expression of the gene coding for 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 174(12), Jun 1992.
- [166] A Richter-Dahlfors, AM Buchan, and BB Finlay. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella* typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes *in vivo*. *J Exp Med*, 186(4), Aug 1997.
- [167] RC Rickert, J Roes, and K Rajewsky. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res*, 25, 1997.
- [168] JK Riley, K Takeda, S Akira, and RD Schreiber. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem*, 274(23), Jun 1999.
- [169] A Roers, L Siewe, E Strittmatter, M Deckert, D Schlueter, W Stenzel, AD Gruber, T Krieg, K Rajewsky, and W Mueller. T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation. *J Exp Med*, 200, 2004.

LITERATURVERZEICHNIS

- [170] A Roers, L Siewe, E Strittmatter, M Deckert, D Schlueter, W Stenzel, AD Gruber, T Krieg, K Rajewsky, and W Mueller. T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation. *J Exp Med*, 200(10), Nov 2004.
- [171] YP Rubtsov, JP Rasmussen, EY Chi, J Fontenot, L Castelli, X Ye, P Treuting, L Siewe, A Roers, WR Henderson, W Muller, and AY Rudensky. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*, 28(4), Apr 2008.
- [172] L Salez and D Malo. Protagonistes de l'immunité innée dans les infections salmonelles. *Med Sci (Paris), Review: French*, 20(12), Dec 2004.
- [173] R Samarasinghe, P Tailor, T Tamura, T Kaisho, S Akira, and K Ozato. Induction of an anti-inflammatory cytokine, IL-10, in dendritic cells after toll-like receptor signaling. *J Interferon Cytokine Res*, 26(12), Dec 2006.
- [174] PJ Sansonetti. Molecular and cellular mechanisms of invasion of the intestinal barrier by enteric pathogens. The paradigm of Shigella. *Folia Microbiol (Praha)*, 43(3), 1998.
- [175] PJ Sansonetti. The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. *Nat Immunol*, 7(12), Dec 2006.
- [176] PJ Sansonetti, J Arondel, MJ Cavaillon, and M Huerre. Role of interleukin-1 in the pathogenesis of experimental shigellosis. *J Clin Invest*, 96(2), Aug 1995.
- [177] PJ Sansonetti and A Phalipon. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Journal of Bacteriology*, 11(3), June 1999.
- [178] RL Santos, S Zhang, RM Tsois, RA Kingsley, LG Adams, and AJ Baumler. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect*, 3(14), Nov 2001.
- [179] DC Savage. Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. *Annu Rev Nutr*, 6, 1986.
- [180] H Schmieger. Phage P22 mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol. Gen. Genet*, 119, 1972.
- [181] RK Sellon, S Tonkonogy, M Schultz, LA Dieleman, W Grenther, E Balish, DM Rennick, and RB Sartor. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun*, 66(11), Nov 1998.
- [182] Devang Shah, Higan Zhang, Arkady B Khodursky, Niilo Kaldalu, Kristi Kug, and Kim Lewis. Persister: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiology*, 6(53), June 2006.
- [183] C Nagler-Anderson and HN Shi. Peripheral nonresponsiveness to orally administered soluble protein antigens. *Crit Rev Immunol*, 21(1-3), 2001.

- [184] VK Shreedhar, BL Kelsall, and MR Neutra. Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches. *Infect Immun*, 71(1), Jan 2003.
- [185] VK Shukla, H Singh, M Pandey, SK Upadhyay, and G Nath. Carcinoma of the gallbladder—is it a sequel of typhoid? *Dig Dis Sci*, 45(5), May 2000.
- [186] L Siewe, M Bollati-Fogolin, C Wickenhauser, T Krieg, W Mueller, and A Roers. Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA. *Eur J Immunol*, 36, 2006.
- [187] M Singer and PJ Sansonetti. IL-8 is a key chemokine regulating neutrophil recruitment in a new mouse model of *Shigella*-induced colitis. *J Immunol*, 173(6), Sep 2004.
- [188] DW Smith and C Nagler-Anderson. Preventing intolerance: the induction of nonresponsiveness to dietary and microbial antigens in the intestinal mucosa. *J Immunol*, 174(7), Apr 2005.
- [189] DM Stalker, WR Hiatt, and L Comai. A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. *J Biol Chem*, 260(8), Apr 1985.
- [190] B Stecher, S Hapfelmeier, C Mueller, M Kremer, T Stallmach, and WD Hardt. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun*, 72(7), Jul 2004.
- [191] S Sukupolvi, A Edelstein, M Rhen, SJ Normark, and JD Pfeifer. Development of a murine model of chronic *Salmonella* infection. *Infect Immun*, 65(2), Feb 1997.
- [192] XF Sun and H Zhang. NFkB and NFkB I polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. *Histol Histopathol*, 22(12), Dec 2007.
- [193] BC Sydora, MM Tavernini, A Wessler, LD Jewell, and RN Fedorak. Lack of interleukin-10 leads to intestinal inflammation, independent of the time at which luminal microbial colonization occurs. *Inflamm Bowel Dis*, 9(2), Mar 2003.
- [194] K Takeda, T Kaisho, and S Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 21, Dec 2001.
- [195] M Tone, MJ Powell, Y Tone, SA Thompson, and H Waldmann. IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J Immunol*, 165(1), July 2000.
- [196] C Tuekel, M Raffatellu, D Chessa, RP Wilson, M Akelik, and AJ Baeumler. Neutrophil influx during non-typhoidal salmonellosis: who is in the driver's seat? *FEMS Immunol Med Microbiol*, 46(3), Apr 2006.
- [197] SN Ukena, A Singh, U Dringenberg, R Engelhardt, U Seidler, W Hansen, A Bleich, D Bruder, A Franzke, G Rogler, S Suerbaum, J Buer, F Gunzer, and AM Westendorf. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Inhibits Leaky Gut by Enhancing Mucosal Integrity. *PLoS One*, 2(12), Dec 2007.

LITERATURVERZEICHNIS

- [198] SN Ukena, AM Westendorf, W Hansen, M Rohde, R Geffers, S Coldewey, S Suerbaum, J Buer, and F Gunzer. The host response to the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917: specific up-regulation of the proinflammatory chemokine MCP-1. *BMC Med Genet*, 6(43), Dec 2005.
- [199] AW van der Velden, SW Lindgren, MJ Worley, and F Heffron. *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Infect Immun*, 68(10), Oct 2000.
- [200] AW van der Velden, M Velasquez, and MN Starnbach. *Salmonella* rapidly kill dendritic cells via a caspase-1-dependent mechanism. *J Immunol*, 171(12), Dec 2003.
- [201] Nora Vasquez-Laslop, Hyunwoo Lee, and Alexander A Neyfakh. Increased Persistence in *Escherichia coli* caused by controlled expression of toxins or other unrelated proteins. *Journal of Bacteriology*, 188(10), May 2006.
- [202] A Vazquez-Torres, J Jones-Carson, AJ Baeumler, S Falkow, R Valdivia, W Brown, M Le, R Berggren, WT Parks, and FC Fang. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature.*, 401(6755), Oct 1999.
- [203] A Vazquez-Torres, Y Xu, J Jones-Carson, DW Holden, SM Lucia, MC Dinuer, P Mastroeni, and FC Fang. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science*, 287(5458), Mar 2000.
- [204] M Vijay-Kumar, CJ Sanders, RT Taylor, A Kumar, JD Aitken, SV Sitaraman, AS Neish, S Uematsu, S Akira, IR Williams, and AT Gewirtz. Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest*, 117(12), Dec 2007.
- [205] J Wain, TT Hien, P Connerton, T Ali, CM Parry, NT Chinh, H Vinh, CX Phuong, VA Ho, TS Diep, JJ Farrar, NJ White, and G Dougan. Molecular typing of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi from Vietnam: application to acute and relapse cases of typhoid fever. *J Clin Microbiol*, 37(8), Aug 1999.
- [206] A Wakkach, N Fournier, V Brun, JP Breittmayer, F Cottrez, and H Groux. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*, 18(5), May 2003.
- [207] PR Watson, EE Galyov, SM Paulin, PW Jones, and TS Wallis. Mutation of *invH*, but not *stn*, reduces *Salmonella*-induced enteritis in cattle. *Infect Immun*, 66(4), Apr 1998.
- [208] J Wehinger, F Gouilleux, B Groner, J Finke, R Mertelsmann, and RM Weber-Nordt. IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Lett*, 394(3), Oct 1996.

LITERATURVERZEICHNIS

- [209] S Wildt, LK Munck, L Vinter-Jensen, BF Hanse, I Nordgaard-Lassen, S Christensen, S Avnstroem, SN Rasmussen, and JJ Rumessen. Probiotic treatment of collagenous colitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. Lactis. *Inflamm Bowel Dis*, 12(5), May 2006.
- [210] Yvonne Willer. Angeborene und adaptive Immunität gegen Darmbakterien. *Dissertation*, Humboldt-Universität zu Berlin, 2007.
- [211] DJ Worst, MM Gerrits, CM Vandenbroucke-Grauls, and JG Kusters. *Helicobacter pylori* ribBA-mediated riboflavin production is involved in iron acquisition. *J Bacteriol*, 180(6), Mar 1998.
- [212] TA Wynn, R Morawetz, T Schariton-Kersten, S Hieny, HC Morse 3rd, R Kuehn, W Mueller, AW Cheever, and A Sher. Analysis of granuloma formation in double cytokine-deficient mice reveals a central role for IL-10 in polarizing both T helper cell 1- and T helper cell 2-type cytokine responses in vivo. *J Immunol*, 159(10), Nov 1997.
- [213] RJ Xavier and DK Podolsky. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), Jul 2007.
- [214] X Yang, J Gartner, L Zhu, S Wang, and RC Brunham. IL-10 gene knockout mice show enhanced Th1-like protective immunity and absent granuloma formation following *Chlamydia trachomatis* lung infection. *J Immunol*, 162(2), Jan 1999.
- [215] Douglas Young, Tracey Hussell, and Gordon Dougan. Chronic bacterial infections: living with unwanted guests. *Nature Immunology*, 3(11), Nov 2002.
- [216] H Zeng, AQ Carlson, Y Guo, Y Yu, LS Collier-Hyams, JL Madara, AT Gewirtz, and AS Neish. Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. *J Immunol*, 171(7), Oct 2003.
- [217] H Zeng, AQ Carlson, Y Guo, Y Yu, LS Collier-Hyams, JL Madara, AT Gewirtz, and AS Neish. Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. *J Immunol*, 171(7), Oct 2003.
- [218] G Zhang and S Ghosh. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem*, 277(9), Mar 2002.
- [219] S Zhang, RA Kingsley, RL Santos, H Andrews-Polymenis, M Raffatellu, J Figueiredo, J Nunes, RM Tsois, LG Adams, and AJ Bäumler. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infect Immun*, 71(1), Jan 2003.
- [220] S Zhang, RA Kingsley, RL Santos, H Andrews-Polymenis, M Raffatellu, J Figueiredo, J Nunes, RM Tsois, LG Adams, and AJ Bäumler. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infect Immun*, 71(1), Jan 2003.
- [221] S Zhang, RL Santos, RM Tsois, S Stender, WD Hardt, AJ Bäumler, and LG Adams. The *Salmonella enterica* serotype typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect Immun*, 70(7), Jul 2002.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|---|
| Amp | Ampicillin |
| APC | Antigenpräsentierende Zelle |
| B6 | C57BL/6 |
| Bp | Basenpaar |
| bzw | beziehungsweise |
| C57BL/6 | Wildtyp-Mausstamm |
| DAP | Diaminopimellinsäure |
| DC | Dendritische Zelle |
| DSS | Dextran sulphate sodium |
| CpG | cytidin-phosphate-guanosin |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ds | doppelsträngig |
| E. | <i>Escherichia</i> |
| EcN | <i>E. coli</i> Nissle |
| EHEC | enterohämorrhagische <i>E. coli</i> |
| EPEC | enteropathogene <i>E. coli</i> |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| et al. | und weitere |
| etc. | et cetera |
| FACS | fluorescence-activated cell sorter |
| FAE | Follikel-assoziiertes Epithel |
| FKS | fötales Kälberserum |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FSC | forward Scatter |
| GALT | gut associated lymphoid tissue |
| GFP | green fluorescent protein |
| GRO-a | growth-regulated oncogen-a |
| h | Stunde |
| HP-NAP | Helicobacter pylori neutrophil-activating protein |
| Hsp | Heat-shock protein |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---------------|--|
| HZI | Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung |
| IFN | Interferon |
| IFR | interfollikuläre Region |
| Ig | Immunglobulin |
| I κ B | Inhibitor von NF κ B |
| IL | Interleukin |
| IL-1R | Interleukin-1 Rezeptor |
| iNOS | induzierbare NO-Synthase |
| i.v. | intra venös |
| Kan | Kanamycin |
| kb | Kilobasen |
| KBE | Koloniebildende Einheit |
| KC | Keratinocyte-derived chemokine |
| kDa | Kilo Dalton |
| KO | Knock-out |
| L-Ara | L-Arabinose |
| LB | Luria-Bertani |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LTA | Lipoteichonsäure |
| MAMP | microbe-associated molecular pattern |
| MCP | monocyte chemoattractant pattern |
| MHH | Medizinische Hochschule Hannover |
| MHC | major-histocompatibility complex |
| MIP | macrophage inflammatory protein |
| mLN | mesenteriale Lymphknoten |
| MyD | myeloid differentiation protein |
| M-Zellen | membranöse Zellen (microfold cells) |
| NF κ B | nuclear factor of κ light chain enhancer in B cells |
| NLR | NOD like receptors |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOD | nucleotide-binding oligomerization domain |
| NOS | NO-Synthase |
| Nramp | natural resistance associated macrophage protein |
| n.s. | nicht significant |
| OD600 | optische Dichte bei 600nm |
| OVA | Ovalbumin |
| PAMP | pathogen-associated molecular pattern |
| PE | Phycoerythrin |
| PEEC | pathogen-elicited epithelial chemoattractant |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------|---|
| PGN | Peptidoglykan |
| p.i. | post Infektion |
| PMN | Neutrophile Polymorphkernige Granulozyten |
| POD | Peroxidase |
| PP | Peyersche Platten |
| PRR | pathogen-recognition receptor |
| RES | Retikuendotheliales System |
| S. | <i>Salmonella</i> |
| Stm | <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium |
| SCV | <i>Salmonella</i> -containing vacuole |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SED | subepitheliale Domregion |
| SPI | Salmonella pathogenicity island |
| SPF | Spezifisch Pathogen-frei |
| Spp. | nur bis auf die Genusebene typisierte Bakterienstämme |
| SSC | sideward scatter |
| Strep | Streptomycin |
| Taq | <i>Thermophilus aquaticus</i> |
| T3SS | Typ-3-Sekretionssystem |
| Th1 | T-Helfer-Zelle Typ 1 |
| Th2 | T-Helfer-Zelle Typ 2 |
| Th3 | T-Helfer-Zelle Typ 3 |
| TIR | toll/IL-1 related |
| TIRAP | TIR-Adaptorprotein |
| TLR | toll-like receptor |
| TNF | Tumornekrosis-Faktor |
| Tollip | Toll-interacting protein |
| TRAF | TNFR-associated factor |
| Treg | regulatorische T-Zellen |
| usw | und so weiter |
| WT | Wildtyp |

Danksagung

Der erste und wichtigste Dank gilt meinen beiden Betreuern Prof. Dr. Werner Müller und Prof. Dr. Dirk Bumann, die mir die beiden spannenden Themen bereitgestellt haben und mir immer mit Rat und Tat bei Fragen zur Seite standen. Für konstruktive Kritiken und Ratschläge als auch für die netten und aufmunternden nicht-fachlichen Diskussionen möchte ich mich bei Euch bedanken und wünsche Euch viel Erfolg in euren neuen Heimaten.

Prof. Dr. Wehland danke ich für die Übernahme der Begutachtung meiner Arbeit und für die herzliche Leitung eines Arbeitsbereiches mit vielen netten Mitarbeitern.

Prof. Dr. Korte danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Außerdem möchte ich mich beim Graduiertenkolleg GRK705/II der MHH unter der Leitung von Prof. Hans-J. Hedrich, Dr. Dirk Wedekind und Dr. Marie-Luise Enss nicht nur für die finanzielle Unterstützung sondern vor allem für die freundliche Aufnahme in die Gruppe bedanken. Den anderen GRK-Teilnehmern danke ich für die vielen schönen Momente und die Aufmunterungen, dass man nicht der einzige ist, bei dem nicht alles so klappt wie es soll. Es war eine unvergessliche Zeit, bei der man viel fachliches und menschliches lernen konnte. Schade das die 3 Jahre mit Euch so kurz waren.

Meinen Kollegen von der MHH Yvonne Willer, Nguyen Quang Le, Somedutta Barat und Christian Stelter danke ich für die Hilfsbereitschaft und das äußerst freundliche Arbeitsklima. Besonders hervorheben möchte ich hierbei Beatrice Müller für ihre grandiose technische Assistenz. Aber auch Anika Münk, die zwar nicht zu unserer Gruppe gehörte aber dennoch eine liebe Seele ist, möchte ich herzlich danken. Mit ihr hatte auch der schlechteste Tag noch Sonnenschein. Bei Anika und Yvonne möchte ich mich außerdem noch für die Möglichkeit der Übernachtung bedanken, wenn ich mal keine Lust auf einen 1,5 stündigen Heimweg oder Bahn-Streiks hatte.

Den Kollegen vom HZI danke ich besonders für die freundliche Integration in die Gruppe, die durch meine anfangs nur seltene Anwesenheit erschwert war. Marina Greweling, Angela Schippers und Bastian Pasche danke ich für die Bereitstellung der Versuchstiere,

unseren TAs Maria Ebel, Sieglinde Keilholz-Gast, Heike Petrat, Anke Samuels und Mirjam Schwarzkopf für die Genotypisierung und den Tierpflegern des HZI für die Betreuung der Mäuse und Ordnungshaltung in der Tiereinrichtung. Blair Prochnow danke ich für die super Zeit und gute Ablenkung, wie schon während meiner Diplomarbeit. Auch allen hier nicht namentlich erwähnten Mitgliedern von EI möchte ich für die Hilfsbereitschaft, die tolle Atmosphäre und schöne Zeit, auch nach der Arbeit, danken.

Für das Korrekturlesen möchte ich nicht nur meinen beiden Betreuern, sondern außerdem noch Marina, Yvonne und Blair meinen tiefsten Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Till, meiner und seiner Familie und allen Freunden, die durch ihre liebevolle und moralische Unterstützung, sowie der gelegentlichen Ablenkung bewirkt haben, dass ich nicht die Lust an der Promotion verloren habe.